

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Ciências  
Departamento de Química e Bioquímica



**Estudo Calorimétrico do efeito do  $H_2O_2$  no metabolismo da  
*Saccharomyces cerevisiae***

**Valdir Avelino Rocha Semedo**

Dissertação de mestrado

Mestrado em Bioquímica

Área de especialização Bioquímica Médica

**2014**

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Ciências  
Departamento de Química e Bioquímica



**Estudo Calorimétrico do efeito do  $H_2O_2$  no metabolismo da  
*Saccharomyces cerevisiae***

**Valdir Avelino Rocha Semedo**

Dissertação de mestrado

Mestrado em Bioquímica

Área de especialização Bioquímica Médica

Orientadores: Fernando Antunes e Manuel E. Minas da Piedade

**2014**

# I. Abstract

The work carried out on this thesis is part of a project whose long-term aim is to investigate the application of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), the main oxidant of the cell, as a pharmacological agent. In this thesis, for the first time a calorimetric method was applied in order to study metabolic modifications induced by the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to *Saccharomyces cerevisiae* cells. Two calorimetric techniques were used: flux and batch microcalorimetry performed in LKB 10700-1 and LKB TAM 2277 models, respectively. The work implied the development of reaction vessels for both calorimeters and the optimization of experimental conditions in order to succeed in detecting the energy modifications associated to the cellular metabolism and its response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Main results were: (1) calibration constant, the volume of the calorimetric cell and the time of residence in the cell were determined for the LKB 10700-1 model; (2) growth curve of *Saccharomyces cerevisiae* for the wild-type strain (wt), for the strain deleted in the cytosolic catalase gene (ctt1), and deleted in five peroxiredoxin genes ( $\Delta 5$ ) obtained by calorimetry compared well with that observed by optical density; (3) calorimetric analysis showed the existence of oscillations in the metabolism of *Saccharmyces cerevisiae* during his normal growth and alterations in the metabolic rate after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; (4) a similar power is dissipated by cells from the three strains studied during their exponential phase of growth; (5) the calorimetric response to the addition of a sub-lethal dose (150  $\mu$ M) of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is similar in the wt and ctt1 strains, but in the  $\Delta 5$  strain approximately half of the response was observed and a longer period was needed to recover the metabolic response observed before H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition.

In conclusion, in this work calorimetry was successfully applied to investigate the real-time response of living cells to non-lethal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> doses.

**Keywords:** Hydrogen Peroxide, Metabolism, Microcalorimetry, *Saccharmyces cerevisiae*

## II. Resumo

O trabalho desenvolvido nesta tese encontra-se inserido num projecto que tem como objectivo a longo prazo investigar a aplicação do peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), o principal oxidante da célula, como fármaco. Nesta tese, aplicou-se pela primeira vez um método calorimétrico para estudar alterações metabólicas induzidas pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células de *Saccharomyces cerevisiae*. Utilizaram-se dois calorímetros: um microcalorímetro de fluxo LKB 10700-1 e um microcalorímetro de *batch* TAM LKB 2277. O trabalho implicou o desenvolvimento de vasos reaccionais para ambos os calorímetros e a optimização das condições experimentais de modo a conseguir detectar as variações de energia associadas ao metabolismo celular e suas alterações.

Os principais resultados obtidos foram: (1) determinou-se a constante de calibração, o volume efectivo e o tempo de residência na célula calorimétrica do microcalorímetro de fluxo LKB 10700-1; (2) as curvas de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* obtidas por calorimetria para a estirpe selvagem (wt), para as estirpes com deleção do gene do catalase citosólico (ctt1) e com deleção de cinco genes de peroxirredoxinas ( $\Delta 5$ ) foram semelhantes às obtidas por densidade óptica; (3) a análise calorimétrica mostrou a existência de oscilações do metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae* no seu crescimento normal e em alterações na taxa metabólica após exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; (4) a potência dissipada pelas células das diferentes estirpes em fase exponencial do crescimento foi semelhante; (5) a resposta calorimétrica à adição de uma dose sub-letal (150  $\mu$ M) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi semelhante nas estirpes wt e ctt1, mas na estirpe  $\Delta 5$  foi cerca de metade e foi necessário um período superior para que o metabolismo anterior à adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fosse recuperado.

Em conclusão, neste trabalho a calorimetria foi aplicada com sucesso ao estudo em tempo real dos efeitos biológicos do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células vivas.

**Palavras-chaves:** Peróxido de Hidrogénio, Metabolismo, Microcalorimetria, *Saccharomyces cerevisiae*



## III. Índice Geral

I.	Abstract .....	i
II.	Resumo.....	ii
III.	Índice Geral .....	iii
	Índice de Figuras .....	v
	Índice de Quadros.....	ix
IV.	Agradecimentos .....	x
V.	Lista de Abreviaturas.....	xii
1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Âmbito do trabalho .....	1
1.2	Microcalorimetria.....	3
1.3	<i>Saccharomyces Cerevisiae</i> como modelo Biológico.....	7
1.4	Metabolismo Celular .....	10
1.5	Resposta celular ao stresse oxidativo .....	13
1.6	Mecanismos de defesa antioxidante em <i>S.cerevisiae</i> .....	17
2	OBJECTIVOS.....	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	21
3.1	Descrição e optimização dos calorímetros utilizados .....	21
3.1.1	Microcalorímetro de fluxo LKB 10700-1.....	21
3.1.2	Microcalorímetro Thermal analysis monitor LKB 2277 (TAM) .....	28
3.1.3	Microcalorímetro de solução reacção .....	32
3.2	Equipamentos de apoio.....	33
3.3	Reagentes.....	33
3.3.1	Reagentes químicos.....	33
3.3.2	Preparação do meio líquido de cultura sintético completo .....	34

3.3.3	Preparação do meio sólido de cultura .....	34
3.3.4	Material Biológico.....	34
3.4	Determinação da constante de calibração do microcalorímetro de fluxo LKB 10700-1, e do volume efectivo da célula calorimétrica e tempo de residência com hidrólise do 4-hydroxibenzoato de metilo.....	35
3.5	Preparação da cultura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	36
3.5.1	Curvas de crescimento.....	36
3.5.2	Efeito do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> na cultura de leveduras .....	37
3.6	Análise da cultura de leveduras no microcalorímetro Thermal Activity Monitor (TAM) .....	38
4	RESULTADOS .....	39
4.1	Determinação da constante de calibração do microcalorímetro de fluxo LKB 10700-1, e do volume efectivo da célula calorimétrica e tempo de residência com hidrólise do 4-hydroxibenzoato de metilo.....	39
4.2	Calibração eléctrica no meio de cultura sintético completo (sc). ....	43
4.3	Comparação das curvas de crescimento da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> seguidas por densidade óptica e calorimetria .....	45
4.4	Potencia dissipada pela <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na fase exponencial....	52
4.5	Estudo do efeito do peróxido de hidrogénio no metabolismo da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nas diferentes estirpes .....	57
4.6	Estudos de calorimetria em <i>batch</i> .....	63
5	DISCUSSÃO .....	68
6	BIBLIOGRAFIA .....	73

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1:</b> Primeiro calorímetro de reacção isotérmico desenvolvido por Lavoisier e Laplace (Académie des sciences, 1780). .....	5
<b>Figura 1.2:</b> Diagrama de blocos simplificado de um microcalorímetro de fluxo de calor. Adaptado de (Simões and Piedade, 2008). .....	7
<b>Figura 1.3:</b> Representação esquemática do ciclo de vida de <i>S. cerevisiae</i> : Duas células haplóides de diferentes tipos de mating, $a$ e $\alpha$ , podem unir-se originando uma célula diploide $a/\alpha$ que se multiplica por gemulação. Em condições adversas, como escassez de nutrientes, as células diplóides entram em meiose formando ascósporos. A ruptura de ascos liberta quatro esporos que germinam como células haplóides. A cada nova geração, uma célula haplóide pode trocar de tipo. Imagem adaptado de (wikipédia 2014). .....	9
<b>Figura 1.4:</b> Vias metabólicas. Imagem extraída (Tymoczko and Stryer, 2006).....	11
<b>Figura 1.5:</b> Curva típica de crescimento celular; (A) fase “lag”; (B) fase exponencial; (C) fase estacionária; (D) fase de morte.....	12
<b>Figura 3.1 :</b> Ilustração esquemática do sistema LKB 10700-1, microcalorímetro de fluxo modificado utilizado neste trabalho. (1) Unidade calorimétrica, (2) célula de mistura, (3) célula de reacção, (4) câmara de ar termostatzada, (5) termostato do ar, (6) ventilador, (7) banho pré-termostatzado, (8) serpentina de arrefecimento, (9) termopilhas, (10) nanovoltímetro utilizado para monitorar a saída das termopilhas, (11) bomba peristáltica multicanal, (12, 13) tubos que ligam o vaso reaccional com a cultura de células à célula de mistura, (14) tubo que liga à célula de reacção, (15) a resistência eléctrica utilizado para calibração, (16) multímetro do circuito de calibragem, (17) fonte de alimentação do circuito de calibragem, (18) o termístor de precisão utilizado para medir a temperatura precisa do calorímetro, (19) computador para controle das experiências e aquisição de dados, (20) incubadora termostatzada onde está alojado o reactor com a cultura de células.....	22
<b>Figura 3.2:</b> Ilustração esquemática do sistema LKB 10700-1, microcalorímetro de fluxo modificado utilizado neste trabalho. (A) célula de reacção utilizada neste trabalho e (B) célula de mistura, apenas utilizada como referência; (1) tubo de saída da célula de mistura (referência), (2 e 3) os tubos de entrada na célula de mistura e (4 e 5) são respectivamente os tubos de entrada e saída da célula de reacção.....	23
<b>Figura 3.3:</b> Montagem experimental inicial do sistema LKB 10700-1 de fluxo. Incubadora (A), o calorímetro (B), Canais de comunicação que contém os tubos de ligação	

entre o reactor (dentro da incubadora) e as células calorimétricas (seta) e ainda o computador (c) onde os dados são recolhidos pelo programa CBCAL ..... 24

**Figura 3.4:** Sistema de calibração e de recolha de sinal do microcalorimetro de fluxo LKB. De cima para baixo tem a fonte de tensão DC (*Aligent 6611C*), multímetro (*Aligent 34401A*) e nanovoltímetro (*Aligent 34420A*). ..... 25

**Figura 3.5:** Exemplo de uma resposta calorimétrica típica de uma experiência em que no eixo Y está representado o sinal calorimétrico ( $\mu\text{V}$ ) e no eixo X o tempo (s). Linha de base (A), adição da cultura de células ou outro reagente (seta vertical), chegada da cultura ou reacção exotérmica à célula calorimétrica (seta horizontal); o intervalo entre a seta e a queda do sinal represente o tempo de que demora a cultura de células a chegar à célula *flow-through*. ..... 25

**Figura 3.6:** Balão de erlenmeyer utilizado nas experiências. .... 26

**Figura 3.7:** Novo reactor construído com um agitador magnético. .... 27

**Figura 3.8:** Interior da incubadora com o novo reactor (A) dentro do copo de vidro de paredes duplas (B) com passagem de água termostatzada por um banho externo; suporte do reactor (seta). .... 27

**Figura 3.9:** Exterior da incubadora (A) utilizada na realização das experiências no microcalorimetro de fluxo LKB 10700-1 com temperatura controlada por um controlador de ar e por um banho (B). .... 28

**Figura 3.10:** (A) Calorímetro LKB 2277 TAM, *Thermal Activity Monitor* e uma célula de plástico (B); Os quatro canais deste calorímetro encontram-se identificados nas quatro rodas laranjas (setas); Vê-se também o nanovoltímetro que faz a recolha de dados. A célula de plástico (B) é utilizado para colocar a amostra a ser monitorada calorimetricamente. O tubo enrolado sobre o eixo que contém a célula de plástico é utilizado para fazer adições de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à cultura. .... 30

**Figura 3.11:** Esquema do interior do microcalorimetro TAM. (1) Suporte da célula calorimétrica, (2) célula calorimétrica na posição de pré-equilíbrio, (3) copo de medida onde entra a célula, (4) Elemento de Peltier, termopilha e (5) metal dissipador de calor. .... 31

**Figura 3.12:** Calorímetro de solução reacção *Isoperibol Thermometric Precision solution calorimeter*. O copo de vidro Pirex (1), termístor (2), resistência (3), agitador/suporte (4), ampola (5), quebra ampolas (6), termostato *Termal Activity Monitor* (7). .... 33

**Figura 3.13:** Bureta automática (*CRISON 1S*) utilizada para fazer adições de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. ... 37

**Figura 4.1:** Calibração eléctrica e reacção de hidrólise do 4-hidroxibenzoato de metilo numa solução de NaOH 0,5 M em função do tempo. São mostradas duas calibrações eléctricas realizadas com 100 e 130  $\mu\text{V}$ , respectivamente, indicadas pelas setas duplas. É mostrada ainda

uma reacção de hidrólise do 4-hidroxibenzoato iniciada pela adição deste reagente (seta simples). ..... 40

**Figura 4.2:** Calor libertado ( $J.s^{-1}$ ) em função do tempo da reacção de hidrólise do 4-hidroxibenzoato de metilo. .... 41

**Figura 4.3:** Linearização da energia térmica dissipada ( $J.s^{-1}$ ) durante a reacção de hidrólise do 4-hidroxibenzoato de metilo em função do tempo (s). .... 42

**Figura 4.4:** Calibrações eléctricas no meio de cultura sc variando a intensidade aplicado à resistência. Três calibrações sequenciais estão indicadas pelas setas e foram feitas com 145, 50 e 80  $\mu V$ , respectivamente. .... 44

**Figura 4.5:** Curva de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae*, estirpe wt (○), estirpe Ctt1 (×) e estirpe 5Δ (▲). A OD<sub>600</sub> inicial foi de 0,05, mostrando-se em B os resultados obtidos em escala logarítmica. .... 46

**Figura 4.6:** (A) Curva de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae*, estirpe selvagem (wt) By4741 acompanhado por microcalorimetria. A adição da cultura de células ocorreu aos 103 minutos, isto é, a volta de 1,72 horas (indicada pela seta pequena). Nota-se as 3 principais fases de crescimento característico da cultura. As fases a, b e c correspondem as fases lag, exponencial e estacionária respectivamente. (B) Ampliação da Figura A para evidenciar oscilações metabólicas na fase pós-diauxica e estacionária (setas). .... 48

**Figura 4.7:** (Superior) Curva de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae*, estirpe com deleção da catalase (ctt1) By4741 acompanhado por microcalorimetria. (Inferior) Ampliação da Figura superior onde evidencia oscilações metabólicas na fase pós-diauxica e estacionária (setas). .... 50

**Figura 4.8:** (Superior) Curva de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae*, estirpe com deleção das cinco peroxirredoxinas (Δ5) By4741 acompanhado por microcalorimetria. (Inferior) Ampliação da Figura A onde evidencia oscilações metabólicas na fase pós-diauxica e estacionária (setas). .... 51

**Figura 4.9:** Resposta calorimétrica à adição da cultura de *Saccharomyces cerevisiae* na fase exponencial de crescimento. A seta indica a adição de células da estirpe selvagem (0,264 OD<sub>600</sub>) ao calorímetro. .... 52

**Figura 4.10:** Perfil característico da adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à cultura de *Saccharomyces cerevisiae* (estirpe selvagem, wt). (A) A Figura mostra 3 adições bolus de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150  $\mu M$  (círculos) e a seta o tempo da adição da cultura (OD<sub>600</sub>=0,25); (B e C) mostram uma ampliação da primeira e segunda adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respectivamente. As setas indicam a adição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na cultura. O intervalo de tempo entre a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a alteração do sinal calorimétrico

reflecte o tempo que a cultura demora a chegar à célula calorimétrica. Este tempo de atraso é aproximadamente 2 minutos quando o fluxo é de 1.0 mL/min. .... 58

**Figura 4.11:** Perfil característico da adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a cultura de *saccharomyces cerevisiae* (BY4741-ctt1) analisada calorimetricamente no microcalorímetro de fluxo LKB-10-700. (A). A Figura mostra as 4 adições de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nos círculos, (B e C) mostram uma ampliação da primeira e segunda adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respectivamente. .... 59

**Figura 4.12:** Perfil característico da adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à cultura de *Saccharomyces cerevisiae*, a estirpe com deleções das cinco peroxirredoxinas (BY4741-Δ5) analisada calorimetricamente no microcalorímetro de fluxo LKB-10-700. (A). A Figura mostra 3 adições bolus de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 μM, indicadas pelos círculos. (B e C) mostram uma ampliação da primeira e segunda adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respectivamente. .... 60

**Figura 4.13:** Variação da densidade óptica a 600 nm em função do tempo de uma cultura da *Saccharomyces cerevisiae*, estirpe selvagem, para estimar valores de OD<sub>600</sub> por adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na cultura em questão. .... 61

**Figura 4.14:** Adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à cultura *Saccharomyces cerevisiae* (estirpe selvagem) no TAM. O gráfico representa a tensão eléctrica em função do tempo (min). Os três picos são a primeira, a segunda e a terceira adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 μM, respectivamente. .... 64

**Figura 4.15:** Adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao meio de cultura sc no TAM. O gráfico representa a tensão eléctrica em função do tempo (min). Os três picos são a primeira, a segunda e a terceira adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente. .... 64

**Figura 4.16:** Curva da dissolução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no meio sc por calorimetria de solução a 298K. A Figura mostra a variação de temperatura em função do tempo: (a) linha de base, (b1 e b2) calibração eléctrica, (c) quebra da ampola com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. .... 65

**Figura 4.17:** Adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a uma cultura de *Saccharomyces cerevisiae* (estirpe selvagem) no TAM numa célula de plástico. Representa-se a tensão eléctrica em função do tempo (s). Os três picos são a primeira, a segunda e a terceira adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150 μM), respectivamente. .... 66

## Índice de Quadros

<b>Quadro 1.1:</b> Identificação de proteínas reprimidas e estimuladas após exposição ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Resumo do quadro (Godon et al., 1998) .....	14
<b>Quadro 3.1:</b> Estirpes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> usados no trabalho .....	36
<b>Quadro 4.1:</b> Resultados das duas calibrações eléctrica relativa a experiencia representada na Figura 4.1.....	41
<b>Quadro 4.2</b> Resultados obtidos para a constante de calibração ( $\epsilon$ ), o volume efectivo ( $V_c$ ) e o tempo de residência ( $\tau$ ) para várias experiências independentes .....	43
<b>Quadro 4.3</b> Constantes de calibração obtida em cinco experiencias independentes com meio sc.....	44
<b>Quadro 4.4:</b> Valores experimentais da potência dissipada por células da estirpe selvagem da <i>S. cerevisiae</i> .....	54
<b>Quadro 4.5:</b> Valores experimentais da potência dissipada por células da estirpe com deleção do gene da catálase da <i>S. cerevisiae</i> .....	55
<b>Quadro 4.6:</b> Valores experimentais da potência dissipada por células da estirpe com deleções das cinco peroxirredoxinas da <i>S cerevisiae</i> .....	56
<b>Quadro 4.7:</b> Potência dissipada por célula em cada uma das adições de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> nas diferentes estirpes em estudo .....	62

## **IV. Agradecimentos**

O espaço limitado desta secção de agradecimentos, seguramente, não me permite agradecer, como devia, a todas as pessoas que, ao longo deste meu mestrado em Bioquímica me ajudaram, directa ou indirectamente, a cumprir os meus objectivos e a realizar mais esta etapa da minha formação académica. Desta forma, deixo apenas algumas palavras, poucas, mas com um sentido e profundo Sentimento de gratidão.

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pelo dom da Vida, pelas graças e maravilhas que realizou e realiza em mim todos os dias, por um dia ter tido a oportunidade de aventurar-me por este mundo fora, longe daqueles que significam tudo para mim a fim de aumentar, desenvolver e enriquecer a minha formação académica e crescer como pessoa.

Um obrigado aos meus dois orientadores, Fernando Antunes e Manuel E. Minas da Piedade que me acompanharam e me orientaram no trabalho desenvolvido nesta tese. Para além do grande respeito que tenho pelos dois há em mim uma grande admiração pelos professores que são, pelo conhecimento que possuem e pela vontade de ensinar.

À minha “princesa” preferida, a Susana, por estar sempre ao meu lado e por fazer com que a minha vida fosse e seja mais alegre. MEDNB!

À Felícia Gomes e à Regina Alves por se disponibilizarem sempre a ajudar-me e pelo carinho grande que têm para comigo. Sem vocês seria ainda mais difícil concluir esta etapa, agradeço vos do fundo do meu coração.

Às minhas tias Anita, Neftaly, Isabel, Antónia pelo apoio, carinho e amizade que me foram dando ao longo destes dois anos. A todas vós e aos meus primos, um obrigado pelos bons momentos de convívio. Aproveito para agradecer a Jocilene Santos!

À professora Luísa Cyrne por estar sempre presente e disponível a ajudar-me no Laboratório.



Não podia deixar de agradecer a Cinthia Nakamura que começou esta maratona comigo e a Tatiana Nobre, pela ajuda nas tarefas do laboratório, pelo convívio e pelos bolos da mãe.

Agradeço a grande contribuição do professor Muftah Basheer, pela boa disposição, pela amizade, pelo convívio no laboratório, pelos conselhos e pela grande ajuda na alteração do sistema calorimétrico e desenho do novo reactor utilizado. Um grande abraço.

Agradeço ao Carlos Bernardes pela disponibilidade e apoio ao longo do ano no laboratório.

Agradeço aos meus colegas de laboratório Abhinav Josepf, Joana Vitorino, Ricardo Simões, Rafael Bento, e aos meus colegas de curso pelo contributo que tiveram, de uma ou de outra forma, na realização deste trabalho e de outros anteriores.

Um obrigado ao “povo cantina velha” pelos bons momentos de convívio durante os almoços ao longo do ano lectivo.

Agradeço também à Fundação Millennium BCP e aos SASUL pela ajuda no último ano do mestrado. Obrigado pelo vosso imprescindível apoio.

Aproveito para agradecer ao professor Dong-Yan Jin da Universidade de Hong Kong pela oferta generosa da estirpe  $\Delta 5$ .

Queria terminar esta parte de agradecimento, agradecendo as primeiras pessoas que me ajudaram e motivaram a chegar até aqui. Um Obrigado do tamanho do Mundo aos meus pais, Cecília Rocha e Arlindo Semedo e claro aos meus irmãos, Patrick, Ivan, Indira, Chrisney, Rubem, Eder, Melany e Fabio. Embora não vos veja há mais de seis anos, desde que me aventurei em Portugal para a licenciatura, seguindo-se o mestrado, vocês continuam sendo a minha força todos os dias. Muito em breve estarei convosco, com esta etapa da minha vida concluída.

A vós, **família**, dedico este trabalho!

## V. Lista de Abreviaturas

ATP	Trifosfato de adenosina
CAT	Catalase
Ctt1	Estirpe de <i>S. cerevisiae</i> com deleção do gene do catalase
$\Delta 5$	Estirpe de <i>S. cerevisiae</i> com deleção das 5 peroxirredoxinas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERO	Espécies reactivas de oxigénio
GAPDH	3-fosfato de gliceraldeído desidrogenase
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Forma reduzida do glutathione ( $\gamma$ -glutamylcysteinylglycine)
GSSG	Forma oxidada do glutathione
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogénio
HO <sup>•</sup>	Radical hidróxilo
mRNA	RNA mensageiro
NADPH	Fosfato de dinucleotido de adenina e nicotinamida no estado reduzido
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical anião superóxido
OD <sub>600</sub>	Densidade óptica a 600 nm
PTP1B	Fosfatase de tirosina 1B
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TAM	<i>Thermal activity monitor</i>
TPx	<i>Tiorredoxina peroxidase</i>
YNB	<i>Yeast nitrogen base</i>
Yap	<i>Yeast activator protein</i>
Wt	Estirpe selvagem de <i>S. cerevisiae</i>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Âmbito do trabalho

O trabalho desenvolvido nesta tese encontra-se inserido num projecto que tem como objectivo a longo prazo investigar a aplicação do peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), o principal oxidante da célula, como fármaco. A medicina oxidativa, ou seja, a utilização de oxidantes na terapia de patologias, é um campo inovador, emergente, e ainda altamente controverso, uma vez que surge após décadas em que danos tóxicos são atribuídos aos oxidantes.

O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é produzido na célula de forma natural, resultando do metabolismo aeróbico (Chance et al., 1979). Há evidência de que a administração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em doses controladas pode constituir uma terapia em várias patologias humanas, abrindo assim o campo da medicina oxidativa (Björkman et al., 2008; Le Bourg, 2007; Mesquita et al., 2010; Schroder et al., 2012; Yokoo et al., 2004; Yoo et al., 2011). Isto representa uma visão contrária à de muitos investigadores que consideram a suplementação com antioxidantes como sendo benéfica para a saúde. Se por um lado há evidência epidemiológicas sobre os efeitos benéficos dos antioxidantes, os ensaios clínicos realizados até à data não confirmam esses efeitos benéficos, e por vezes até evidenciam um efeito prejudicial para a saúde causado pela suplementação de antioxidantes (Bjelakovic et al., 2007; Goodman et al., 2011). Este paradoxo pode ser compreendido se se considerar o não estabelecimento de relações causa-efeito nos estudos epidemiológicos. Por outro lado, hoje associa-se ao comportamento dos oxidantes curvas dose-resposta não clássicas com hormese (Forman et al., 2014).

O termo hormese descreve relações dose-resposta, caracterizadas por uma inversão de resposta de algum ponto final biológico relevante (por exemplo, a proliferação ou a longevidade) entre baixas e altas doses de produtos químicos, moléculas biológicas ou factores de *stress* físicos.(Kendig et al., 2010). Este fenómeno tem suscitado grande interesse na comunidade científica sendo amplamente discutido

## **Introdução**

na literatura biomédica, principalmente nas áreas da toxicologia, e de protecção a radiações (Calabrese and Baldwin, 2003).

Foram estudadas as respostas de adaptação ao *stress* oxidativo do peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) na levedura *Saccharomyces cerevisiae* BYRZ53. Os resultados mostraram que o crescimento de células *naive* é facilmente preso ao desafio do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Em contraste, as células que foram pré-expostas a doses relativamente baixas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são capazes de sobreviver a uma dose subsequente e continuam a dividir-se a taxas normais. O aumento da resistência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas células pré-tratadas foi transitório, sendo prontamente revertido durante 60-90 min de crescimento na ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Davies et al., 1995).

A nível molecular existe evidência do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ser benéfico para várias patologias. Talvez os exemplos mais claros sejam os da **diabetes e obesidade**. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mimetiza a acção da insulina por um mecanismo molecular que envolve a inibição do fosfatase de tirosina PTP1B (Mahadev, 2001). Esta via molecular é altamente relevante para a diabetes tipo II, a forma mais comum de diabetes, caracterizada pela resistência das células à acção da insulina. O PTP1B inibe o receptor de insulina, e assim, a inibição do PTP1B pode evitar a resistência das células à acção da insulina. De facto quando o PTP1B é suprimido, os ratinhos aumentam a sensibilidade aos efeitos benéficos da insulina e não desenvolvem diabetes (Elchebly, 1999). Além disso, os animais tornam-se resistentes à obesidade induzida por dietas ricas em glúcidos e lípidos (Kasubaska et al., 2002), facto provavelmente explicado pelas funções semelhantes do PTP1B exercidas na via da transdução do sinal da insulina e da leptina, uma importante hormona regulatória do apetite a nível do hipotálamo. Infelizmente, o desenvolvimento de fármacos contra o PTP1B não tem tido sucesso (Haque et al., 2011), Mas, sendo o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o inibidor endógeno deste fosfatase, coloca-se a hipótese de aplicar farmacologicamente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para estimular as vias de transdução da insulina e da leptina.

Para além do exemplo anterior ainda existem outros que ilustram potenciais efeitos benéficos do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como: (a) **doenças vasculares** - recentemente, observou-se a indução da protecção da vasculatura durante a isquémia e a inflamação pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido na reacção catalisada pelo enzima NADPH oxidase, Nox4 (Schroder et al.,

## **Introdução**

2012); (b) **cicatrização** – em trabalhos com elevado impacto observou-se, um papel importante para este processo exercido pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Yoo et al., 2011); (c) **doença granulomatosa crónica** – esta doença caracteriza-se pela deficiência em NADPH oxidase (enzima catalisador da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) da qual resulta um estado de inflamação crónica, apoiando a hipótese de um papel anti-inflamatório para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Björkman et al., 2008); (d) vários investigadores observaram efeitos no prolongamento do tempo de vida exercidos pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, quando a teoria mais comum é os oxidantes promoverem o **envelhecimento** (Yokoo et al., 2004).

Para estudar se há potencialmente efeitos benéficos da exposição celular a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é necessário, em primeiro lugar, desenvolver e otimizar uma metodologia que permita observar as alterações que eventualmente ocorrem aquando da exposição das células a doses sub-letais de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A microcalorimetria é uma técnica com grande potencial para este tipo de estudos devido à sua elevada sensibilidade e ao facto de, ao contrário das técnicas espectrofotométricas, não necessitar de transparência óptica. Permite, para além disso, monitorizar o calor associado ao metabolismo celular em tempo real e de forma não invasiva. Tem como principal desvantagem o facto de não ser específica, ou seja detecta o calor produzido pelo metabolismo celular, mas a resposta é global. Não fornece, assim, informação sobre qual a(s) via(s) metabólica(s) mais directamente relacionada(s) com alterações do sinal calorimétrico associadas à adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. É por isso, importante desenvolver estratégias que permitam interpretar os resultados a nível molecular.

O presente projecto centrou-se no desenvolvimento de metodologias experimentais para estudar a hormese do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> usando microcalorimetria de fluxo de calor.

## **1.2 Microcalorimetria**

Há mais de 200 anos que calorimetria tem sido aplicada no estudo de sistemas biológicos (Kleiber, 1961). Crawford na Escócia e Lavoisier e Laplace na França mediram produção de calor na respiração de animais. Durante as primeiras décadas do

**Estudo Calorimétrico do efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae***  
**Introdução**

seculo XX a calorimetria da respiração “calorimetria do corpo inteiro” foi mais extensivamente utilizada na medição do calor produzido por animais e pessoas quando em repouso ou realizando trabalho mecânico (Silva, 1984).

A actividade biológica é o resultado da ligação entre as reacções de abastecimento (catabolismo), que são reacções exotérmicas e biossintéticas (anabolismo), que são endotérmicas. A força motriz destas reacções é medida pela respectiva variação de energia de Gibbs,  $\Delta_r G$ . Embora  $\Delta_r G$  seja a variável termodinâmica fundamental que sustenta o crescimento, é apenas variação de entalpia de reacção ( $\Delta_r H$ ) que é mensurável por calorimetria (mudança de temperatura ou fluxo de calor). Por outras palavras  $\Delta H$  é igual ao calor libertado ou absorvido, isto é, pode ser positivo ou negativo nos processos exotérmicos e endotérmicos respectivamente. A relação fundamental entre estes dois parâmetros é dada pela equação 1.1

$$\Delta_r G = \Delta_r H - T\Delta_r S \text{ (equação 1.1)}$$

onde  $T$  é a temperatura do sistema e  $\Delta_r S$  a variação de entropia. O calor que é liberado por quase todos os processos biológicos é consequência da dissipação de energia de Gibbs para sustentar reacções termodinamicamente desfavoráveis. Dissipação é o custo para executar reacções não espontâneas. (Brown, 1998)

$$\Delta_r G_{\text{crescimento}} = \Delta_r G_{\text{catabolismo}} + \Delta_r G_{\text{anabolismo}} \text{ (equação 1.2)}$$

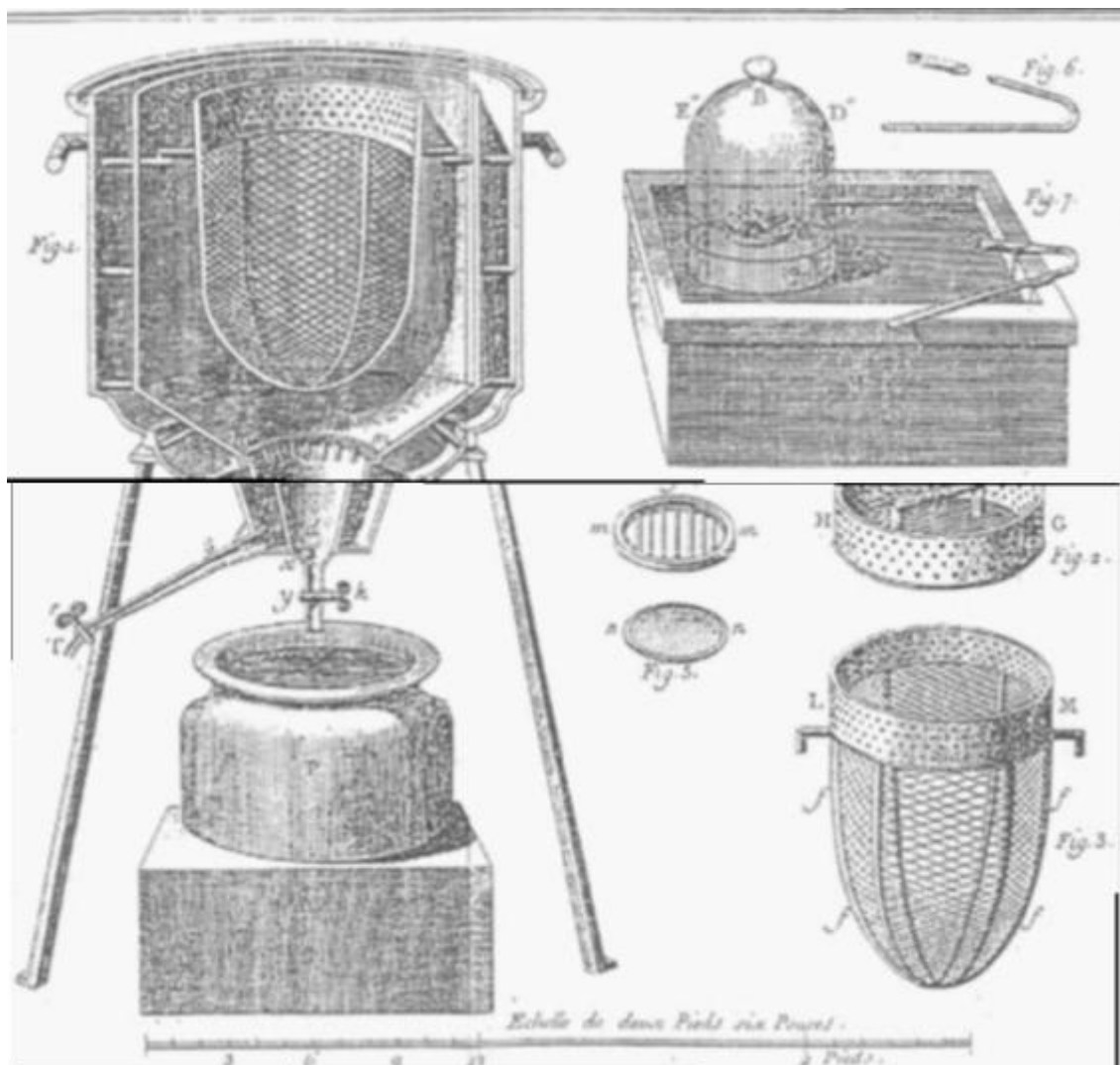
$$< 0 \qquad \ll 0 \quad + \quad > 0$$

Historicamente, Lavoisier foi o primeiro que relacionou a respiração com combustão, numa famosa experiência em que colocou um pássaro sob uma campânula de vidro. Da mesma forma, ele relatou a relação entre a geração de calor e actividade metabólica. De facto, a taxa de fluxo de calor proporciona uma medida da actividade biológica. (Brown, 1998).

A primeira aplicação de calorimetria de organismos vivos é certamente a medida do calor gerado por uma cobaia, relatada em 1780 por Lavoisier e Laplace. Eles colocaram o animal numa câmara rodeada por gelo e uma camada de isolamento (Académie des sciences, 1780). Admitindo que o gelo é o único dissipador de calor e

*Estudo Calorimétrico do efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no metabolismo da Saccharomyces cerevisiae*  
**Introdução**

que a actividade metabólica do animal a única fonte de calor, a quantidade de água recolhida deve ser proporcional ao calor produzido pela cobaia.



**Figura 1.1:** Primeiro calorímetro de reacção isotérmico desenvolvido por Lavoisier e Laplace (Académie des sciences, 1780).

A maioria das transformações químicas e físicas, incluindo as que ocorrem nos sistemas biológicos, ocorre em condições de pressão constante. Para quantificar o fluxo de calor para dentro e para fora do sistema num processo a pressão constante, usa-se a grandeza entalpia (H). Contudo, o que se mede normalmente é a variação de entalpia,  $\Delta H$ .

❖ **Calorímetro de condução de calor**

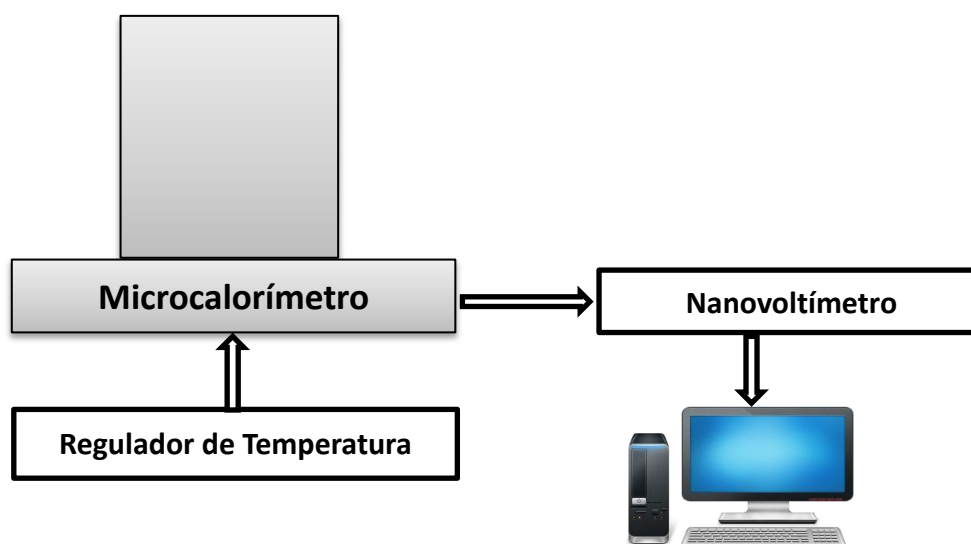
Na calorimetria de condução de calor, a taxa de fluxo de calor produzido no interior do reactor é transferido para a parede circundante, termopilha (contendo grande quantidade de junções idênticas de termopares dispostas em torno da célula reaccional) que gera e conduz a uma tensão (V) proporcional à taxa de fluxo de calor ( $dQ / dt$ ). Ver equação 1.3.

$$V = k \cdot \frac{dQ}{dt} \text{ (equação 1.3)}$$

A constante de proporcionalidade  $k$  pode ser determinada experimentalmente por calibração. Calorímetro de condução de calor tem um baixo limite de detecção, mas a identificação de qualquer alteração na taxa de fluxo de calor é lenta. Por conseguinte, este tipo de calorímetro é adequado para retardar os processos de produção de pequenas quantidades de calor.

Os calorímetros de fluxo de calor modernos têm células individuais; assim, eles operam em modo diferencial. Isto significa que as termopilhas eléctricas das células da amostra e da referência estão ligadas em oposição, de modo que a medida saída seja a diferença entre as respectivas forças termoeléctricas. Os sistemas electrónicos auxiliares de um instrumento de fluxo de calor são relativamente simples, como se mostra no diagrama de blocos da Figura 1.2. O dispositivo principal é uma interface entre o nanovoltímetro e um computador para controle do instrumento, aquisição e manipulação de dados. Os restantes sistemas electrónicos de um microcalorímetro (não mostrado na Figura 1.2) estão relacionadas com o controlo preciso da temperatura do termostato e, em alguns casos, com a calibração do instrumento eléctrico. (Simões and Piedade, 2008)





**Figura 1.2:** Diagrama de blocos simplificado de um microcalorímetro de fluxo de calor. Adaptado de (Simões and Piedade, 2008).

### 1.3 *Saccharomyces Cerevisiae* como modelo Biológico

Para estudar a capacidade hormética do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e os seus efeitos benéficos na saúde é importante encontrar um modelo biológico que tenha características muito próximas das células humanas. Muitos genes de leveduras têm mostrado ser ortólogos no genoma humano, incluindo alguns genes causadores de doenças. Várias proteínas humanas podem ser funcionalmente substituídas para os seus análogos de levedura após a transfecção de genes humanos em levedura (Gershon and Gershon, 2000).

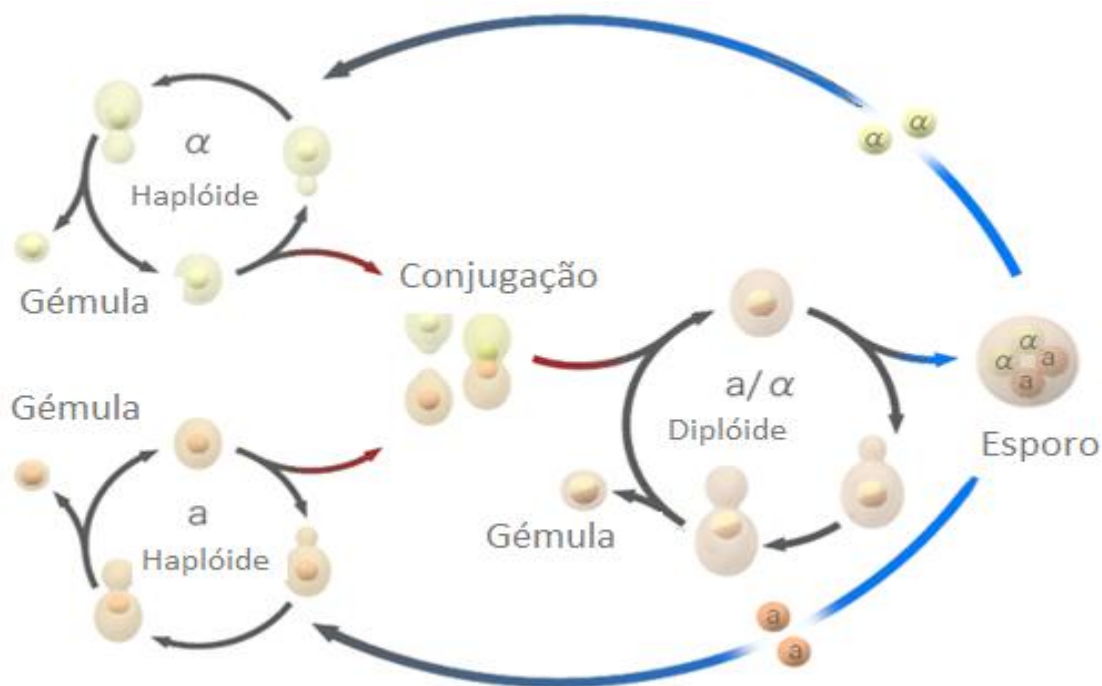
*S. cerevisiae* é um eucariota, fungo unicelular, pertencente ao filo de Ascomycete. Apresenta uma organização intracelular complexa que consequentemente leva a mecanismos complexos de regulação da expressão genética tal como nos organismos multicelulares.

A utilização das leveduras como modelo experimental apresenta inúmeras vantagens, genéticas, bioquímicas e fisiológicas. A *S. cerevisiae* é de fácil manipulação, e tem um tempo de duplicação relativamente curto. A sua genética é bem conhecida e isso permite que a construção de mutantes definidos seja relativamente simples.

### **Introdução**

Destaca-se ainda um custo de manutenção e crescimento, comparativamente a outros sistemas biológicos bastante mais reduzido; o facto de não ser patogénico, não havendo factor de risco para o manipulador; como já mencionado um tempo de duplicação relativamente curto, cerca de 90 minutos; apresenta várias semelhanças com os eucariotas superiores a nível dos organitos, macromoléculas, mecanismos básicos de replicação, divisão celular e metabolismo. A facilidade de manipulações genéticas associadas ao conhecimento completo da sequência de DNA permite que a construção de mutantes definidos seja relativamente simples, obtendo assim estirpes diferentes resultantes de deleção de genes. A levedura *S. cerevisiae* é provavelmente o eucariota mais estudado e, por conseguinte, amplamente utilizado na investigação biológica nas mais diversas áreas desde de processos específicos ao envelhecimento.

*S. cerevisiae* pode ser plaqueada em placas de ágar como células individuais e observa-se um crescimento clonal. Reproduz-se quer por gemulação (reprodução assexuada) quer por conjugação (reprodução sexuada). Ao contrário de muitos outros microrganismos, a *S. cerevisiae* tem o genoma estável tanto na forma haplóide como diplóide e pode proliferar se em ambos os estados (Figura 1.3). O crescimento vegetativo destas células eucariotas unicelulares ocorre habitualmente por gemulação. Uma célula-filha cresce a partir de uma gémula da célula-mãe. Segue-se a divisão nuclear, formação da parede celular e finalmente a separação das células.



**Figura 1.3:** Representação esquemática do ciclo de vida de *S. cerevisiae*: Duas células haplóides de diferentes tipos de mating, *a* e  $\alpha$ , podem unir-se originando uma célula diplóide *a/α* que se multiplica por gemulação. Em condições adversas, como escassez de nutrientes, as células diplóides entram em meiose formando ascósporos. A ruptura de ascos liberta quatro esporos que germinam como células haplóides. A cada nova geração, uma célula haplóide pode trocar de tipo. Imagem adaptado de (wikipédia 2014).

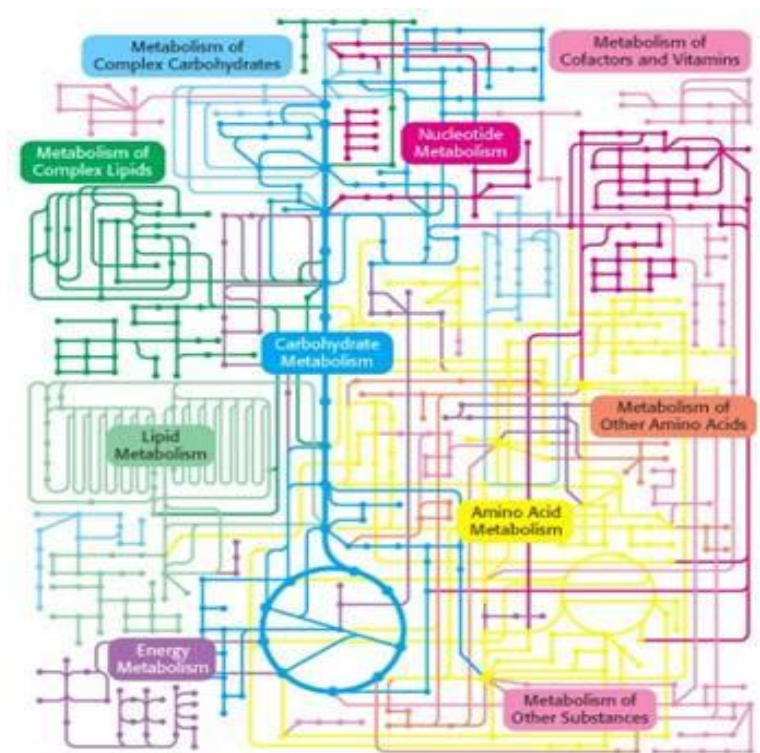
A capacidade de duas células haplóides *a* e  $\alpha$  se conjugarem, fundirem e originarem uma célula diplóide *a/α* é denominada de *mating* ou reprodução sexuada. O tipo de *mating* de cada célula é determinado pelo *locus MAT* (**MATing type**). Células com o alelo *MAT $\alpha$*  são do tipo  $\alpha$ , secretam pequenos péptidos (feromonas) deste tipo e expressam na superfície celular receptores de péptidos de tipo complementar. Similarmente, células com o alelo *MAT*a** são do tipo *a*, secretam feromonas *a* e reconhecem feromonas  $\alpha$  à sua superfície. O reconhecimento de feromonas de tipo complementar leva à aproximação das células haplóides em questão, fusão celular e nuclear numa única célula diplóide heterozigótica *a/α*. Estas células podem, mediante as condições ambientais, dividir-se mitoticamente ou, se sob défice nutricional, dividir-se meioticamente. Quando as condições externas são desfavoráveis para as células diplóides, a meiose ocorre, causando o aparecimento de quatro esporos haplóides

Neste caso originarão 4 células haplóides, duas de cada tipo, **a** e **α**. Se as condições o proporcionarem, os esporos germinarão e dividir-se-ão mitoticamente.

## **1.4 Metabolismo Celular**

Para estudarmos os efeitos do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas células pretendemos observar as alterações no metabolismo induzido pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em doses não letais. A microcalorimetria permite-nos determinar o calor libertado e consequentemente a taxa metabólica. O metabolismo celular é constituído por uma rede grande e complexa de reacções químicas (Figura 1.4) (Tymoczko and Stryer, 2006) catalisadas enzimaticamente. Estas ocorrem sequencialmente e de forma coordenada, com o principal objectivo de gerar um ou mais produtos específicos (metabolitos e ATP), que serão utilizados subsequentemente nas etapas de biossíntese. O processo metabólico é tradicionalmente dividido em duas etapas conhecidas como **catabolismo** e **anabolismo**. O catabolismo ou metabolismo oxidativo é a via pela qual as macromoléculas, constituintes celulares (glícidos, proteínas, lípidos, etc.) são oxidativamente degradados com o objectivo de produzir energia química (na forma de ATP) e intermediários metabólicos para processos biossintéticos. São exemplos a via da β-oxidação de ácidos gordos e a glicólise. O anabolismo ou metabolismo reductivo, também conhecido como via biossintética, é o processo pelo qual as biomoléculas são sintetizadas a partir de moléculas mais simples e energia (ATP), que são em grande parte oriundas das vias catabólicas.

*Estudo Calorimétrico do efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no metabolismo da Saccharomyces cerevisiae*  
**Introdução**

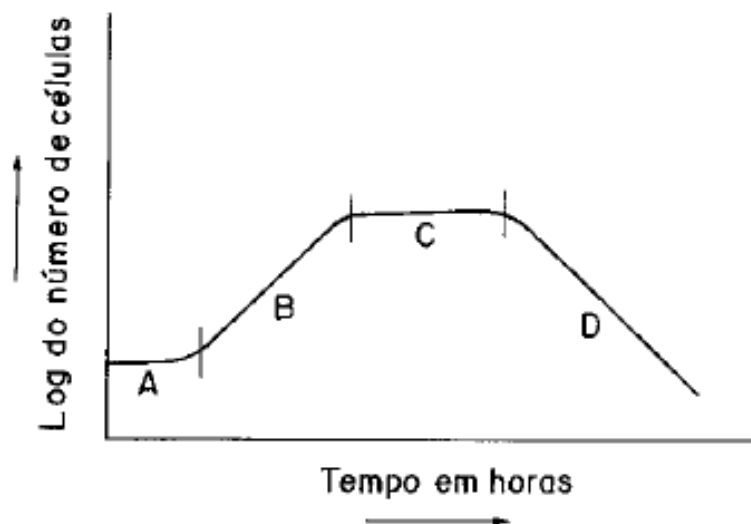


**Figura 1.4:** Vias metabólicas. Imagem extraída (Tymoczko and Stryer, 2006).

Na maioria das espécies de levedura o catabolismo ocorre por duas vias principais, fermentação e/ou respiração. Em algumas espécies de leveduras estes dois processos podem ocorrer concomitantemente, como no caso da *S. cerevisiae*. Esse fenómeno depende das condições do meio, principalmente da concentração da glicose e da limitação de oxigénio do meio.

Por um lado, em condições nas quais existem elevadas concentrações de glucose, frutose ou maltose, a tendência é utilizar fermentação alcoólica, ou seja, o piruvato resultante da glicólise é oxidado a etanol. Quando há escassez destas fontes no meio a levedura consome o etanol. A *S. cerevisiae* tem um crescimento dividido em três fases (Figura 1.5) (Rettori and Volpe, 2000), (A) a chamada fase “lag”, corresponde a uma fase de adaptação fisiológica das células ao novo meio de cultura no qual elas foram introduzidas. Nesta fase o metabolismo das células está activo (sintetizando enzimas e coenzimas) de modo a criar as condições para que elas se possam dividir. Portanto, na fase “lag” as células não se dividem. A fase (B) é conhecida como a fase exponencial de crescimento porque o número de células aumenta exponencialmente com o tempo. E a fase (C) denomina-se de estacionária, onde o número de células

viáveis se mantêm constante, isto é, são iguais os números correspondentes as células que nascem e as que morrem. Após esta última fase as células entram na chamada “fase da morte” pois as condições do meio vão se tornando cada vez mais impróprias para as células sobreviverem.



**Figura 1.5:** Curva típica de crescimento celular; (A) fase “lag”; (B) fase exponencial; (C) fase estacionária; (D) fase de morte.

A fase B, exponencial é caracterizada pela intensa actividade metabólica celular pois para o crescimento exponencialmente, é preciso muita energia, isto é, a célula necessita produzir grandes quantidades de ATP à custa de um grande consumo de uma fonte de carbono. Este processo catabólico (produção de ATP a partir de uma fonte de carbono) é exotérmico (Jr et al., 2013) e o balanço deste com os demais processos catabólicos e anabólicos que ocorrem no interior da célula também é exotérmico. Uma célula liberta calor quando está activa metabolicamente portanto a microcalorimetria é uma técnica que pode ser utilizada no estudo do metabolismo celular.

## 1.5 Resposta celular ao stresse oxidativo

O oxigénio molecular é o aceitador final de electrões ideal porque a sua elevada afinidade por electrões fornece grande força impulsora termodinâmica. Todos os organismos de crescimento aeróbico estão continuamente expostos a espécies reactivas de oxigénio (ERO). A exposição contínua aos EROs gera stresse oxidativo quando a concentração de oxidantes excede a capacidade tampão antioxidante da célula levando a danos celulares (Sies, 1997).

As principais espécies reactivas de oxigénio formadas em ambiente celular são: o peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), o radical hidróxilo (HO<sup>•</sup>), e o radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), mas outras espécies reactivas tóxicas podem ser produzidos a partir da reacção entre as ERO e outros compostos (Temple et al., 2005). O radical superóxido O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, pode ser formado na cadeia transportadora de electrões situada na membrana interna mitocondrial, sendo também formado durante o metabolismo microssomal. Este radical não é muito reactivo mas pode reagir directamente com algumas proteínas (Gardner and Fridovich, 1991). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é produzido pela dismutação do O<sub>2</sub><sup>•-</sup> catalisada pelo superóxido dismutase, assim como na oxidação de ácidos gordos nos peroxisomas (Aruoma et al., 2006). Contrariamente ao O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, que devido à sua carga não atravessa membranas celulares, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode difundir-se através de membranas.

O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é considerado um oxidante fraco. Surge associado à oxidação de grupos sulfidrilo (-SH) levando à diminuição da razão GSH/GSSG, à inactivação de alguns enzimas e determinadas proteínas, associadas à produção e transporte de energia cujo centro activo seja rico em resíduos de cisteína ou que possuam resíduos de cisteína importantes para a sua função devido à oxidação dos grupos sulfídrico (Grant, 2001). No entanto, pode levar à formação *in vivo* do radical hidróxilo via reacção de Fenton (equação 1.4):



### **Introdução**

O radical HO<sup>•</sup> formado é altamente reactivo, e reage de forma rápida e indiscriminadamente com metabolitos e macromoléculas, levando à formação de outros radicais.

O estudo do efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em doses sub letais e as respostas ao mesmo é crucial para a compreensão de como organismos unicelulares e multicelulares se adaptam a diversas mudanças do meio ambiente. Tais respostas requerem um sistema complexo de reconhecimento e transdução de sinal, permitindo o crescimento e proliferação da célula bem como a expressão de genes, actividades metabólicas e outras características da célula.

As alterações na expressão de genes subjacentes à resposta da levedura ao stresse oxidativo e à sua adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram analisados por electroforese comparativa em gel bidimensional das proteínas totais celulares em *S.cerevisiae*. O Tratamento das células com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resultou na síntese de pelo menos 115 proteínas enquanto 52 outras proteínas foram reprimidas (Godon et al., 1998). A exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também resulta numa diminuição das proteínas responsáveis por processos biossintéticos e estimulação das vias de degradação de proteínas. Podemos ver no quadro 1 (Godon et al., 1998) a expressão de diversas proteínas envolvidas directamente na resposta ao choque térmico, associadas ao "scavenging" de ERO, proteases e proteínas ligados na reparação de danos moleculares.

**Quadro 1.1:** Identificação de proteínas reprimidas e estimuladas após exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Resumo do quadro (Godon et al., 1998).

<b>Genes</b>	<b>Nome</b>	<b>Repressão</b>	<b>Indução</b>
<b>1. Proteínas com propriedades antioxidantes</b>			
<b>CCP1</b>	Citocromo c peroxidase		+
<b>CTT1</b>	Catalase T		+
<b>GLR1</b>	Glutathione Redutase		+
<b>SOD1</b>	Cu/Zn-SOD		+
<b>SOD2</b>	Mn-SOD		+
<b>TRR1</b>	Tiorredoxina Redutase		+
<b>TRX (1/2)</b>	Tiorredoxina 1 ou 2		+



### Introdução

<b>TSA1</b>	Tiorredoxina peroxidase	+
<b>GRX1</b>	Glutarredoxina 1	+
<b>TSA2</b>	Tiorredoxina peroxidase	+
<b>AHP1</b>	Tiorredoxina peroxidase	+
...	...	

## 2. Proteínas de choque térmico e chaperoninas

<b>DDR48</b>	Resposta ao dano no DNA	+
<b>HSC82</b>	Proteína de choque térmico	+
<b>HSP104</b>	Proteína de choque térmico	+
<b>HSP12</b>	Proteína de choque térmico	+
<b>HSP26</b>	Proteína de choque térmico	+
<b>HSP42</b>	Proteína de choque térmico	+
<b>PDI1</b>	Proteína persulfureto isomerase	+
...	...	

## 3. Protéases

<b>CIM5</b>	Subunidade do Proteossoma	+
<b>PRE3</b>	Subunidade do Proteossoma	+
<b>PRE5</b>	Subunidade do Proteossoma	+
<b>PRE8</b>	Subunidade do Proteossoma	+
<b>HSP78</b>	Protease mitocondrial	+
<b>UBA1</b>	Enzima activadora de ubiquitina	+
...	...	

## 4. Proteínas envolvidas na tradução proteica

<b>EFB1</b>	Factor de elongação EF-1	-
<b>EFT1</b>	Factor de elongação EF-2	-
<b>YEF3</b>	Factor de elongação EF-3	-
<b>IF4B</b>	Factor de iniciação eIF4B	+
<b>RPA2</b>	Proteína ribossomal ácida L44	-
...	...	

## 5. Enzimas do metabolismo dos glúcidos

### A. Via dos fosfatos de pentose

*Estudo Calorimétrico do efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no metabolismo da Saccharomyces cerevisiae*

**Introdução**

<b>TAL1</b>	Transaldolase		+
<b>TKL1</b>	Transcetolase		+
<b>TKL2</b>	Transcetolase		+
<b>ZWF1</b>	Glucose 6-fosfato desidrogenase		+
<b>B. Glicólise</b>			
<b>ADH1</b>	Alcoól desidrogenase	-	
<b>ALD5</b>	Aldeido desidrogenase		+
<b>ALD6</b>	Alcoól desidrogenase	-	
<b>ENO1</b>	Enolase		+
<b>GLK1</b>	Glucocinase		+
<b>GLK1</b>	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	-	
...	...		
<b>C. Ciclo do ácido cítrico</b>			
<b>LPD1</b>	Di-hidrolipoamida desidrogenase	-	
<b>MDH1</b>	Malato desidrogenase	-	
<b>PDB1</b>	Piruvato desidrogenase	-	
<b>D. Metabolismo glicerol</b>			
<b>DAK1</b>	Di-hidroxiacetona cinase	-	
<b>GPD1</b>	Fosfato glicerol desidrogenase	-	
<b>GPP1</b>	Fosfato glicerol fosfatase		+
<b>GPP2</b>	Fosfato glicerol fosfatase	-	
<b>E. Metabolismo aminoácidos</b>			
<b>ARG1</b>	Arginosuccinato sintase		+
<b>ARO4</b>	DAHP sintase		+
<b>GDH1</b>	Glutamato desidrogenase	-	
<b>HIS4</b>	AMP ciclo-hidrolase		+
<b>ILV2</b>	Acetolactato sintase	-	
<b>MET6</b>	Metionina sintase	-	
<b>LYS20</b>	Homocitrato sintase		+
<b>F. Síntese purinas e pirimidinas</b>			

**Estudo Calorimétrico do efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae***  
**Introdução**

<b>GUA1</b>	GMP sintetase	-
<b>ADE3</b>	C1- tetra-hidrofolato sintase	-
<b>ADE6</b>	5'-fosforibosilformilglicinamidina sintase	-
<b>ADE57</b>	Fosforibosilamina-glicina ligase	-
<b>URA1</b>	Di-hidrourotato desidrogenase	-

Estes resultados foram obtidos num estudo envolvendo a utilização de uma dose bolus de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e, a resposta obtida envolve muitos mais genes devido quer à própria resposta ao stresse oxidativo quer à elevada alteração do estado redox da célula.

Conforme atrás mencionado, o âmbito deste trabalho é investigar o efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em doses sub-letais no metabolismo celular. A molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é pequena, neutra e capaz de se difundir através das membranas biológicas. Hoje em dia sabe-se que a difusão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas membranas celulares não ocorre de forma livre, podendo mesmo a sua passagem através da membrana ser regulada por alterações a nível da composição membranar (Branco et al., 2004). Esta regulação depende de alterações da composição da membrana. O facto de ser mais estável comparativamente ao radical hidróxilo e ao anião superóxido faz com que seja preferencialmente usada para sinalizações intra- e intercelulares. (Forman et al., 2010)

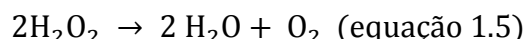
## **1.6 Mecanismos de defesa antioxidante em *S.cerevisiae***

Para protecção contra danos oxidativos, as células desenvolveram mecanismos eficazes de defesa (Grant, 2001). As células possuem sistemas de defesa enzimáticos e não enzimáticos para proteger seus constituintes celulares e manter o estado redox fisiológico. Sistemas de defesas não enzimáticos consistem tipicamente em moléculas pequenas que são solúveis num meio aquoso ou em alguns casos num ambiente lipídico. Eles agem em geral, como “scavengers” de radicais formados por ERO, removendo assim oxidantes da solução (Jamieson DJ, 1998). Mas relevante para o objectivo do trabalho é presença de antioxidantes enzimáticos responsáveis pela remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Estudo Calorimétrico do efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae***  
**Introdução**

Os principais enzimas são catalase (CAT), citocrómio c peroxidase, a peroxirredoxina, tiorredoxina, e tiorredoxina redutase, glutathione peroxidase e redutase. Destaca-se ainda o sistema gerador de NADPH que fornece os equivalentes redutores para estas enzimas.

**Catalase** é um enzima intracelular, encontrado na maioria dos organismos, que decompõe o peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) segundo a equação 1.5.



Na *S. cerevisiae*, existem dois catalases, o A e o T codificadas pelos genes Cta1 e Ctt1 respectivamente. O catalase A encontra-se nos peroxisomas e o principal papel deste enzima está relacionado com a remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido pelo enzima acilo-CoA oxidase, durante a β-oxidação de ácidos gordos (Hiltunen et al., 2003). A função da proteína citoplasmática, catalase T é menos clara. Catalisa a dismutação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água e oxigénio, não sendo necessário cofactor dador de electrões. Expressão do gene CTT1 é, no entanto, regulada por estresse oxidativo, osmótico e pela fome.

Estirpes mutadas nos genes codificantes dos dois catalases (CTA1 e CTT1), não demonstram qualquer alteração ao nível da sensibilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ou qualquer limitação no crescimento exponencial em condições aeróbias relativamente a estirpe selvagem (wt), inferindo-se assim que os catalases não são essenciais na protecção contra o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Izawa et al., 1996a)

O peróxido de hidrogénio tem de ser rapidamente convertido numa espécie química que seja inócua. O catalase tem o mais alto número de *turnover* ( $k_{cat}$ ) conhecido em enzimas: um enzima de catalase pode catalisar a decomposição de até  $4 \times 10^7$  moléculas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por segundo. (Nelson and Cox, 2008).

No entanto, o duplo mutante cta1Δctt1Δ apresenta hipersensibilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em fase estacionária, sugerindo deste modo uma resposta conjunta e cooperativa entre os dois catalases na protecção contra o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> externo. A actividade enzimática dos catalases aumenta quer na protecção ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na fase estacionária, quer na resposta adaptativa ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comparativamente ao seu nível na fase exponencial de crescimento. (Izawa et al., 1996a).

### **Introdução**

**Peroxirredoxinas**, constituem uma família de peroxidases específicos de tiol abundantes encontradas em todos os organismos (Wood et al., 2003). Embora estas enzimas antioxidantes sejam considerados cruciais na defesa celular e sinalização redox, seus papéis fisiológicos exactos são desconhecidas (Wong et al., 2004). Muitos tipos diferentes de peroxirredoxinas são encontrados numa espécie. A *S. cerevisiae* tem cinco tipos conhecidos (Park et al., 2000). Estas proteínas são capazes de reduzir hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos com electrões fornecidos principalmente por NADPH ou NADH e de diferentes proteínas, tais como a tiorredoxina (Trx), glutarredoxina (GRX), e ciclofilina A (Chae et al., 1994; Lee et al., 2001).

**Glucose 6-fosfato desidrogenase, transcetolase e ribulose 5 fosfato epimerase.** Estes enzimas da via pentose de fosfato são essenciais na produção e regeneração de poder redutor na forma de NADPH. Ambos requerem NAPH como redutor para reduzir glutationo oxidada (GSSG) e tiorredoxina. O GSH e tiorredoxina são importantes antioxidantes, por isso, mutações que afectam os enzimas da via das pentoses fosfatos tem um efeito negativo na capacidade de responder ao stresse oxidativo, ficando as células hipersensíveis ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Jamieson DJ, 1998).

**Glutatio no redutase.** Trata-se de um antioxidante importante e o principal agente responsável pela redução do GSSG em GSH, contribuindo assim para a manutenção da elevada proporção GSH/GSSG. Este enzima é codificado pelo gene GLR1 na *S. cerevisiae* e apesar de mutantes nulo serem viáveis apresentam um excesso de glutationo oxidada e hipersensibilidade a oxidantes.(Grant et al., 1996)

**Glutatio no peroxidase.** Como referido anteriormente, o GSH é um antioxidante importante que pode reagir directamente com radicais e electrófilos. GSH também pode agir como uma fonte de electrões de glutationo peroxidase. O enzima glutationo peroxidase catalisa a redução de hidroperóxidos, usando GSH como redutor. É interessante notar que ambas as actividades peroxidases da levedura, glutationo peroxidase, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e hidroperóxidos orgânicos podem ser induzidas por uma mudança de anaerobiose para as condições de crescimento aeróbio (Galiazzo et al., 1987).

## **2 OBJECTIVOS**

A investigação do efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é feita usando a *S. cerevisiae* como modelo biológico, onde estudamos alterações na taxa metabólica por microcalorimetria.

Os principais objectivos, que constituíram o trabalho desenvolvido nesta tese são os abaixo descritos:

1. O primeiro objectivo é criar e desenvolver um método para o estudo do metabolismo celular e de alterações do mesmo em *S. cerevisiae* resultante da exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;
2. O segundo objectivo específico é caracterizar a curva de crescimento não só seguindo a densidade óptica como também o calor produzido pela cultura traduzida no sinal calorimétrico;
3. O terceiro objectivo específico é caracterizar resposta da *S. cerevisiae* em fase exponencial à adição em bolus de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> numa dose sub-letal. Para isso, serão obtidos dados metabólicos em tempo real, nomeadamente, geração de calor;
4. O quarto objectivo será caracterizar em tempo real a resposta a adição em bolus de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> numa dose sub-letal em leveduras em fase exponencial das diferentes estirpes com deleções de genes codificantes para enzimas responsáveis pela remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nomeadamente o catalase citosólica (Cct1), e as cinco peroxirredoxinas (Tsa1, Tsa2, Ahp1, Prx1, Dot5).

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Descrição e optimização dos calorímetros utilizados

Neste trabalho utilizaram-se três calorímetros, o microcalorímetro de fluxo LKB 10700-1, o calorímetro TAM (*Thermal Activity Monitor*) LKB 2277 e o calorímetro isoperibol *Thermometric Precision Solution calorimeter* existentes no grupo de Estrutura e Reactividade do centro de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

#### 3.1.1 Microcalorímetro de fluxo LKB 10700-1

O microcalorímetro de fluxo LKB 10700-1 (Figura 3.1) utilizado encontra-se descrito em (Leskiv et al., 2009), sendo uma modificação do calorímetro original.

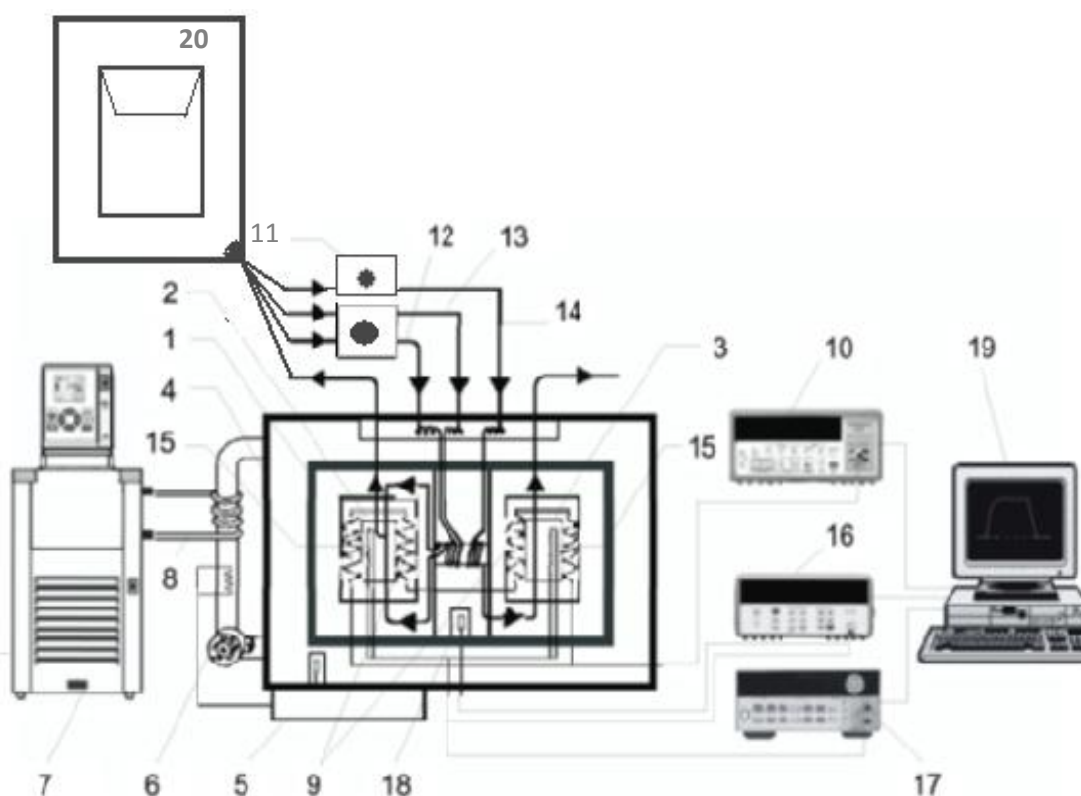
Este aparelho permite determinações precisas de pequenas variações de calor com uma sensibilidade máxima de 0,4  $\mu$ watt (0,1  $\mu$ cal / s). Trabalha no intervalo de temperatura de 20 a 40°C Os reagentes são bombeados para uma célula de reacção, e o fluxo de calor é medido. O calorímetro tem uma célula do tipo “*flow-through*” e outro tipo “*mixing-cell*”. A célula *flow-through* é ideal para estudar culturas celulares (exemplo processos de crescimento) e reacções enzimáticas no qual há um excesso de substrato. Porém para estudo de reacções mais rápidas é mais adequado a célula de mistura. Neste trabalho utilizou-se a célula *flow-through*.

O microcalorímetro LKB 10700-1 opera num ambiente de temperatura constante com a unidade calorimétrica localizado numa camara de ar termostatzada (Figura 3.1). Esta unidade consiste num dissipador de calor em que duas células de reacção, termopilhas e outros elementos de controlo da temperatura estão alojados.

Durante as experiências, a cultura/solução é bombeada com um fluxo constante com auxílio de uma bomba peristáltica para a unidade calorimétrica (Figura 3.2). O calor libertado na célula calorimétrica provoca uma diferença de temperatura e um fluxo de calor entre a célula e o dissipador de calor. O dissipador de calor, de elevada capacidade calorífica, absorve ou liberta este fluxo de calor, enquanto as

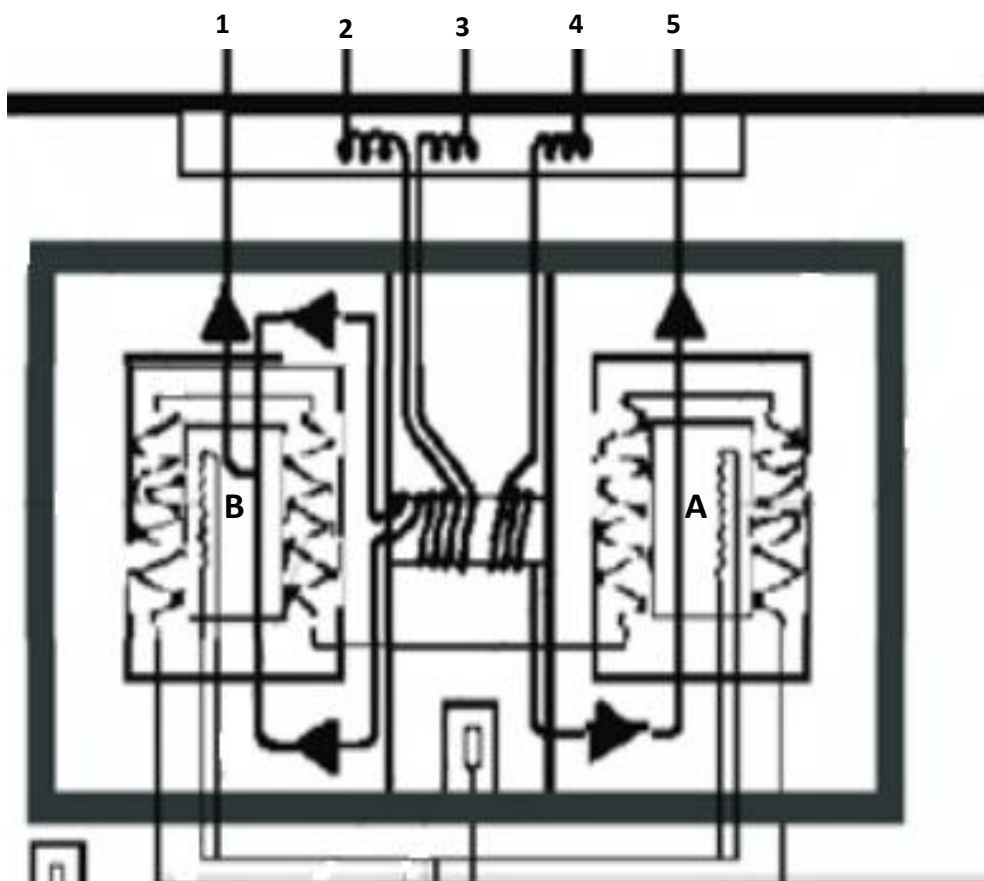
pilhas termoelétricas, localizadas entre a célula e o dissipador de calor (Figura 3.1), medem a diferença de temperatura, a qual é proporcional ao fluxo de calor e à tensão eléctrica gerada.

Na Figura 3.1 está representado não só o sistema do calorímetro LKB 10700-1 modificado como também a incubadora onde são colocadas as amostras em estudo.



**Figura 3.1** : Ilustração esquemática do sistema LKB 10700-1, microcalorímetro de fluxo modificado utilizado neste trabalho. (1) Unidade calorimétrica, (2) célula de mistura, (3) célula de reacção, (4) câmara de ar termostaticada, (5) termostato do ar, (6) ventilador, (7) banho pré-termostaticado, (8) serpentina de arrefecimento, (9) termopilhas, (10) nanovoltímetro utilizado para monitorar a saída das termopilhas, (11) bomba peristáltica multicanal, (12, 13) tubos que ligam o vaso reaccional com a cultura de células à célula de mistura, (14) tubo que liga à célula de reacção, (15) a resistência eléctrica utilizado para calibração, (16) multímetro do circuito de calibragem, (17) fonte de alimentação do circuito de calibragem, (18) o termístor de precisão utilizado para medir a temperatura precisa do calorímetro, (19) computador para controle das experiências e aquisição de dados, (20) incubadora termostaticada onde está alojado o reactor com a cultura de células.

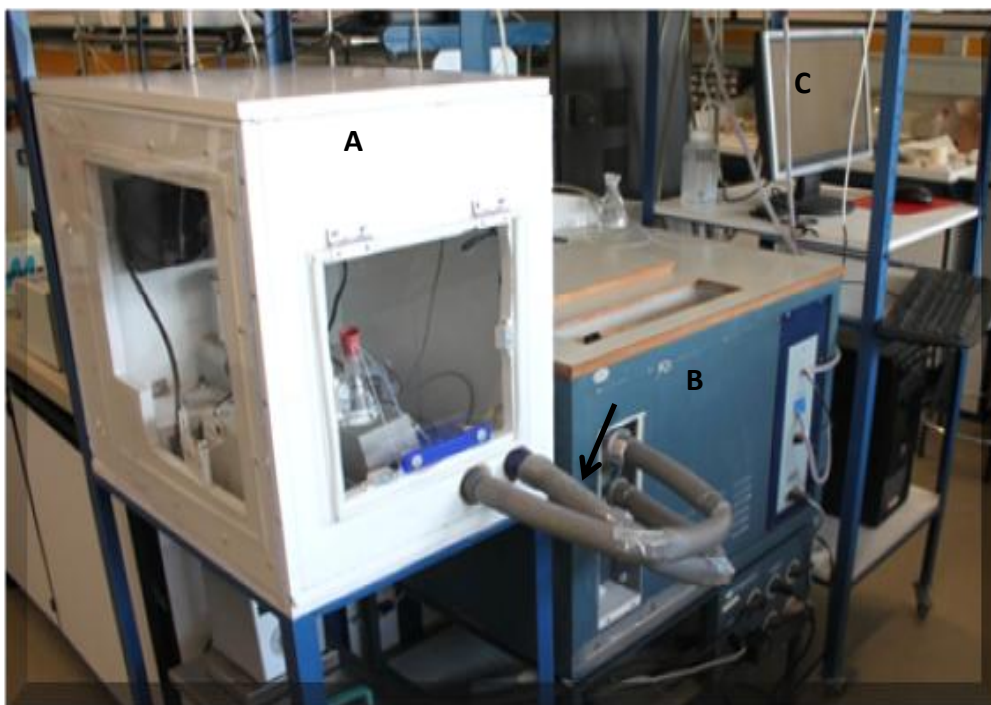




**Figura 3.2:** Ilustração esquemática do sistema LKB 10700-1, microcalorímetro de fluxo modificado utilizado neste trabalho. (A) célula de reacção utilizada neste trabalho e (B) célula de mistura, apenas utilizada como referência; (1) tubo de saída da célula de mistura (referência), (2 e 3) os tubos de entrada na célula de mistura e (4 e 5) são respectivamente os tubos de entrada e saída da célula de reacção.

A temperatura ambiente adequada para a reacção é escolhida e definida no controlador de temperatura mantendo a camara de ar termostatzada a uma temperatura constante. O controlo da temperatura do termostato é feito com uma serpentina de arrefecimento (Figura 3.1, (8)) com água a partir de um banho de água externa pré-termostatzado.

Previamente ao início da experiência calorimétrica, o calorímetro deve estar em equilíbrio com a temperatura escolhida de modo a que cada parte do dissipador de calor tenha a mesma temperatura. Este é mantido a uma temperatura constante por um controlador de temperatura e um sensor.



**Figura 3.3:** Montagem experimental inicial do sistema LKB 10700-1 de fluxo. Incubadora (A), o calorímetro (B), Canais de comunicação que contém os tubos de ligação entre o reactor (dentro da incubadora) e as células calorimétricas (seta) e ainda o computador (c) onde os dados são recolhidos pelo programa CBCAL

#### **3.1.1.1 Sistema LKB inicial no microcalorímetro de fluxo**

As **primeiras experiências** foram feitas com base na montagem mostrado na Figura 3.3. A cultura de células foi transferida para um balão de erlenmeyer e colocada dentro da incubadora (A) com temperatura constante e controlada por um controlador de temperatura (*Julabo*). Um tubo de teflon mergulhado na cultura leva esta para dentro da célula de reacção calorimétrica *flow-through* (A, Figura 3.2) e outro traz de volta para o balão. Em simultâneo outros 2 tubos levam água/meio de outro balão erlenmeyer para a célula de mistura, utilizada como referência enquanto o regresso ao erlenmeyer da água/meio ocorre por intermédio de outro tubo. Portanto quer as células da cultura quer a água utilizada como referência encontram-se num circuito fechado entre os balões dentro da incubadora e a unidade calorimétrica do microcalorímetro de fluxo LKB 10700-1.

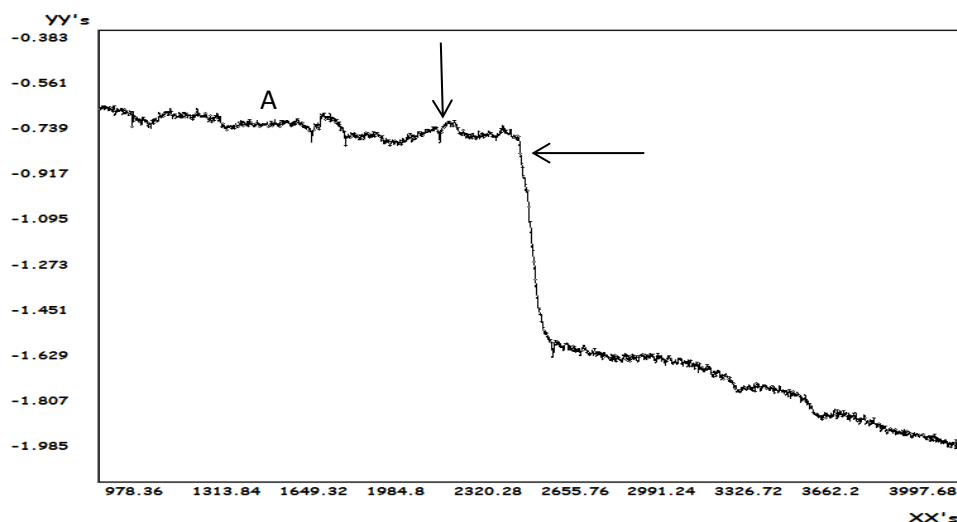
**Estudo Calorimétrico do efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae***  
**Materiais e Métodos**



**Figura 3.4:** Sistema de calibração e de recolha de sinal do microcalorímetro de fluxo LKB. De cima para baixo tem a fonte de tensão DC (Aligent 6611C), multímetro (Aligent 34401A) e nanovoltímetro (Aligent 34420A).

O sistema de calibração e de recolha de sinal do microcalorímetro de fluxo LKB (Figura 3.4) é importante na aquisição de dados e na calibração do aparelho. A calibração eléctrica permite relacionar a potência dissipada e o sinal calorimétrico obtido pelo programa CBCAL 1. É necessário determinar a constante de calibração ( $\epsilon$ ), que multiplicado pela mudança da linha de base ( $Sc$ ) dá o calor libertado por segundo dentro da célula calorimétrica (equação 3.1).

$$W = \epsilon \cdot Sc \text{ (watt ) equação (3.1)}$$



**Figura 3.5:** Exemplo de uma resposta calorimétrica típica de uma experiência em que no eixo Y está representado o sinal calorimétrico ( $\mu V$ ) e no eixo X o tempo (s). Linha de base (A), adição da cultura de células ou outro reagente (seta vertical), chegada da cultura ou reacção exotérmica à célula calorimétrica (seta horizontal); o intervalo entre a seta e a queda do sinal represente o tempo de que demora a cultura de células a chegar à célula *flow-through*.

Na Figura 3.5 observa-se a variação da tensão eléctrica gerada pelas termopilhas em função do tempo. Esta tensão como já referido anteriormente é proporcional a transferência de calor que ocorre na célula calorimétrica. Quando calor é libertado ou absorvido pelo sistema ocorre variação da linha de base. Processos exotérmicos levam a mudança da linha de base para baixo (seta horizontal, Figura 3.5), enquanto que, processos endotérmicos levam a variação da linha de base para cima.



**Figura 3.6:** Balão de erlenmeyer utilizado nas experiências.

#### **3.1.1.2 Alteração do sistema inicial no LKB 10700-1**

Devido a variações casuais da linha base o sistema tal como descrito anteriormente para as primeiras experiências, foi alvo de alterações no sentido de minimizar o ruído da linha base.

O sistema inicial sofreu alterações no reactor utilizado e no controlo da temperatura deste. Para tentar diminuir o ruído, desenhou-se um reactor diferente do balão de erlenmeyer utilizado (Figura 3.6). No sistema anterior a cultura era colocada num balão de erlenmeyer (Figura 3.6) que ficava dentro da incubadora termostaticada pelo controlador de temperatura (*Julabo*). Desenhou-se e construiu-se um novo reactor para utilizar em vez do balão. O novo reactor (Figura 3.7) foi desenhado para estar dentro de um copo de vidro de paredes duplas onde circula água termostaticada de um banho externo. Este banho externo permite que a cultura ou a solução que estiver dentro do novo reactor tenha uma maior inércia térmica. Estas alterações estão representadas nas Figura 3.8 e 3.9.

**Estudo Calorimétrico do efeito do  $H_2O_2$  no metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae***  
**Materiais e Métodos**



**Figura 3.7:** Novo reactor construído com um agitador magnético.

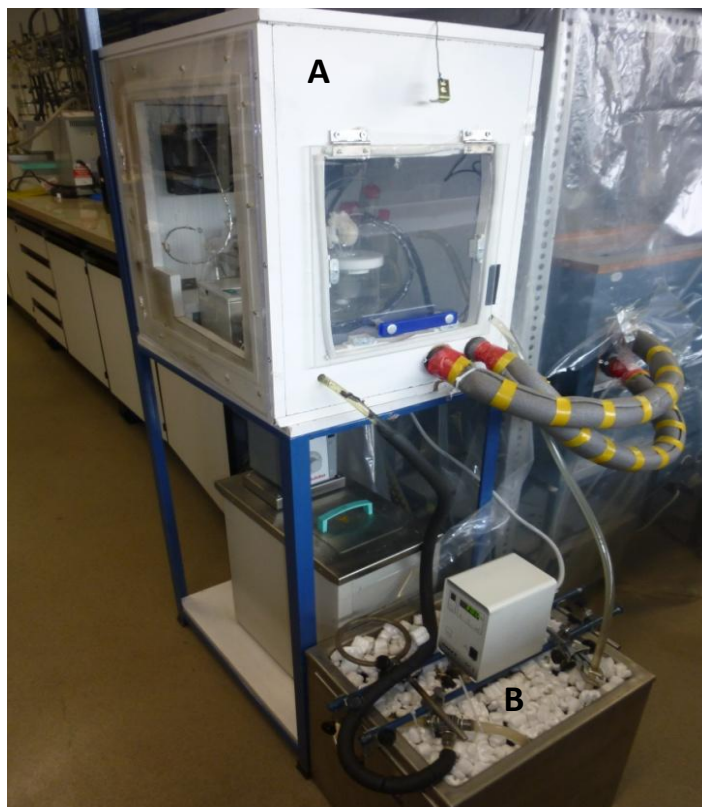
O novo reactor tem um esmerilado que lhe permite encaixar numa tampa de teflon (seta, Figura 3.8) e ficar a 1 cm do fundo do copo de paredes duplas. Também apresenta duas entradas, a maior onde entra e saem os tubos que conduzem a cultura à célula calorimétrica e a mais pequena utilizada para introduzir o tubo oriundo da bureta automática que faz as adições de  $H_2O_2$  a cultura em estudo.

Este sistema revelou ter menos ruído e ser menos sensível a variações do ambiente laboratorial, sendo adequado para o estudo calorimétrico das culturas de células.



**Figura 3.8:** Interior da incubadora com o novo reactor (A) dentro do copo de vidro de paredes duplas (B) com passagem de água termostatzada por um banho externo; suporte do reactor (seta).





**Figura 3.9:** Exterior da incubadora (A) utilizada na realização das experiências no microcalorímetro de fluxo LKB 10700-1 com temperatura controlada por um controlador de ar e por um banho (B).

### **3.1.2 Microcalorímetro Thermal analysis monitor LKB 2277 (TAM)**

Este calorímetro inicialmente chamado LKB BioActivity Monitor (Figura 3.10) foi desenhado como indica o nome para monitorizar actividade de sistemas biológicos. O aparelho é evidentemente adequado para monitorizar de forma directa e continua variações de calor numa ampla gama de processos, biológicos, químicos e físicos. Trabalha no intervalo de temperatura de 20 a 80°C e tem a vantagem de ser multicanal.

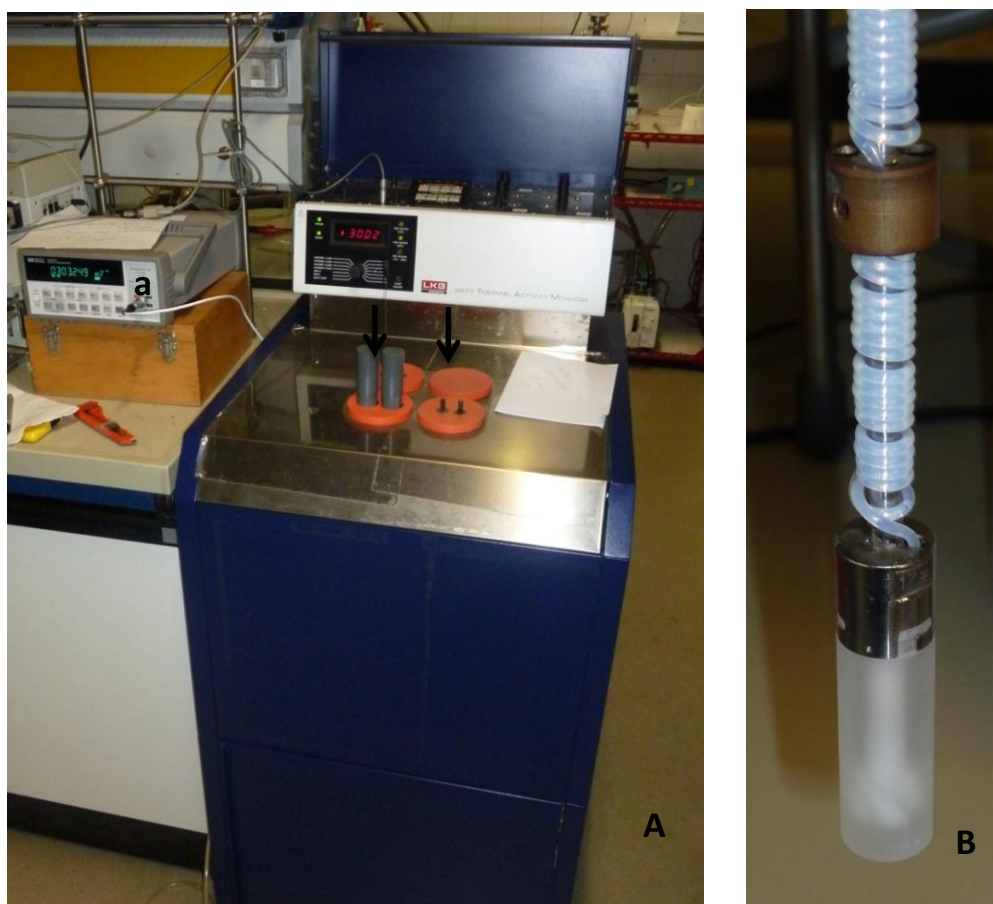
A produção ou absorção de calor dentro de um recipiente termicamente fechado leva a uma alteração de temperatura. O microcalorímetro TAM é à semelhança do microcalorímetro de fluxo um instrumento isotérmico onde os

processos são estudados a temperatura constante. Isto torna possível, que a célula de medição (com a amostra activa) troca calor livremente com os seus arredores, que funcionam como um grande dissipador de calor. Este calor é detectado e medido por termopilhas. O instrumento mede à semelhança do microcalorímetro de fluxo LKB 10700-1, descrito anteriormente, a potência térmica (Joules por segundo ou watts) em vez de calor total (Joules).

A potência térmica na reacção de interesse muitas vezes é extremamente pequena, e por este motivo o TAM incorpora um sistema de detecção térmica multi-canal capaz de detectar um fluxo de calor contínuo tão baixo como 0,1  $\mu$ W, ou pulsos de calor de 10  $\mu$ J. Este calorímetro tem o sistema de controlo de temperatura externo, assistido por uma circulação externa de água termicamente bem controlada. O banho externo funciona como o principal dissipador de calor.

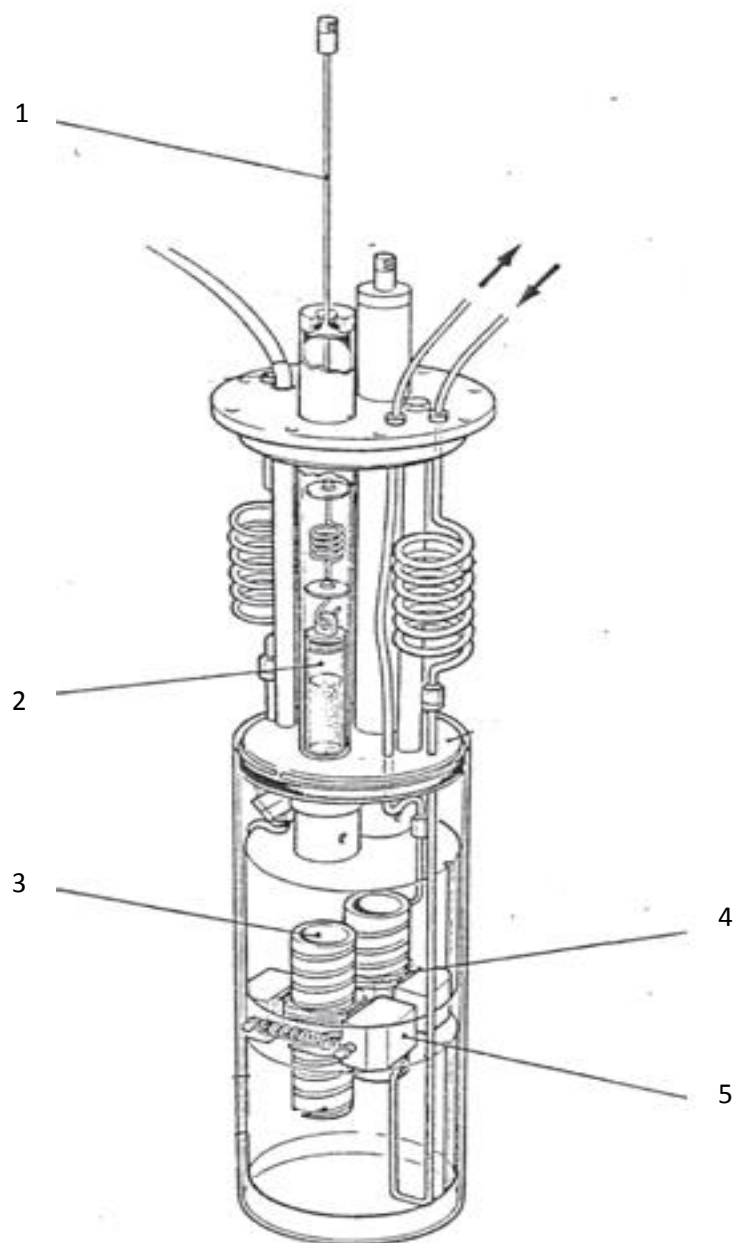
Até quatro cilindros de medição são suspensos num banho de água, cada um dos cilindros contendo uma célula de medida e uma de referência. Cada par de células partilha um dissipador de calor metálico comum, e incorpora elementos de peltier para detectar e medir o fluxo de calor.

As células de medição operam sempre em pares, uma célula de medição (contendo a amostra) e outra de referência. Qualquer diferença do poder térmico entre a célula de referência e a da amostra resulta numa pequena diferença de sinal que é amplificada no amplificador associado ao canal.



**Figura 3.10:** (A) Calorímetro LKB 2277 TAM, *Thermal Activity Monitor* e uma célula de plástico (B); Os quatro canais deste calorímetro encontram-se identificados nas quatro rodas laranjas (setas); Vê-se também o nanovoltímetro que faz a recolha de dados. A célula de plástico (B) é utilizado para colocar a amostra a ser monitorada calorimetricamente. O tubo enrolado sobre o eixo que contém a célula de plástico é utilizado para fazer adições de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à cultura.





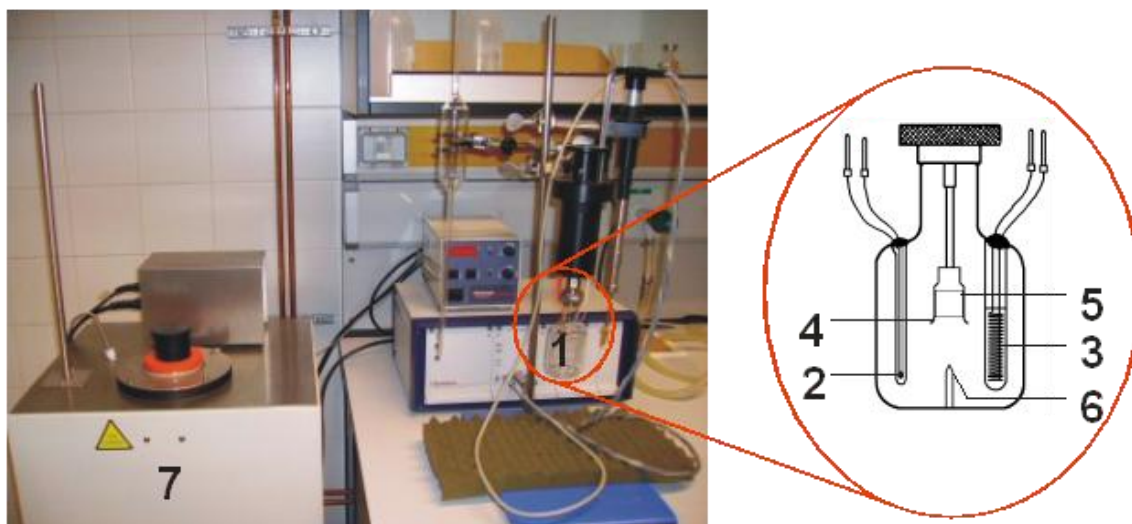
**Figura 3.11:** Esquema do interior do microcalorímetro TAM. (1) Suporte da célula calorimétrica, (2) célula calorimétrica na posição de pré-equilíbrio, (3) copo de medida onde entra a célula, (4) Elemento de Peltier, termopilha e (5) metal dissipador de calor.

### 3.1.3 Microcalorimetria de solução reacção

A calorimetria de solução-reacção foi utilizada para perceber se há reacção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com o meio de cultura, que não fosse detectado no microcalorímetro de fluxo LKB. Estes estudos foram realizados no calorímetro *Isoperibol Thermometric Precision solution calorimeter* (Figura 3.12). O equipamento é regularmente aferido medindo as entalpias de dissolução do tris(hidroximetil)aminometano (THAM), em hidróxido de sódio 0,05 mol.dm<sup>-3</sup> e HCl 0,1 mol.dm<sup>-3</sup> respectivamente ((Nunes et al., 2006) e (Marsh, 1987)). Não foi pois necessário testá-los antes dos ensaios realizados no âmbito da tese.

A célula calorimétrica é composta por um copo de vidro *Pirex*, 1 na Figura 3.12, com um volume útil de 100 cm<sup>3</sup>, que suporta um termistor de 30 k $\Omega$  (a 298.15 K), 2, para a medição da temperatura e uma resistência de 50  $\Omega$ , 3, para a calibração eléctrica. O agitador 4, funciona a 400 rpm, compreende também o suporte para a ampola, 5, com 1 cm<sup>3</sup> de volume que por sua vez contém a amostra (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Na base da célula encontra-se o quebra ampolas 6. A célula calorimétrica está inserida num termostato *Thermal Activity Monitor*, 7, que possui uma estabilidade de  $\pm 10^{-4}$  K.

Numa experiência típica, determinado volume de solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com a concentração conhecida foi colocada numa ampola previamente pesada. A ampola com a solução já fechada foi rigorosamente pesada com uma precisão de  $\pm 10^{-5}$  g numa balança *Mettler Toledo XS205*. O conjunto foi ajustado à célula calorimétrica e esta introduzida no termostato. Após um período de estabilização iniciou-se a curva temperatura-tempo. O processo de dissolução ocorreu após a quebra da ampola em 100 cm<sup>3</sup> de meio. As calibrações eléctricas foram realizadas aplicando uma diferença de potencial de 5 v à resistência, 3, durante pequeno intervalo de tempo, antes e após a quebra da ampola.



**Figura 3.12:** Calorímetro de solução reacção *Isoperibol Thermometric Precision solution calorimeter*. O copo de vidro Pirex (1), termístor (2), resistência (3), agitador/suporte (4), ampola (5), quebra ampolas (6), termostato *Termal Activity Monitor* (7).

## 3.2 Equipamentos de apoio

Ao longo do trabalho utilizaram-se o espectrofotómetro UV Visível (*Thermo Scientific, Genesys 10S UV-Vis*), o microscópio óptico (*ZEISS, west*) a Incubadora e agitador orbital (*HT CH-4103 Bottmingen*), duas estufas (*Jouan e Memmert*), o autoclave (*Uniclave 88*), centrífuga (*Sigma-302*), balanças analíticas (*Mettler AE100 e Mettler Toledo XS205*), duas buretas automáticas (*CRISON 1S e CRISON 4S*), um nanovoltímetro (*Aligent 34420A*), um nanovoltímetro (*HP Hewlett Packard 344a0*) multímetro (*Aligent 34401A*), fonte de tensão (*Aligent 6611C*), controladores de temperatura (*Julabo*), controlador de temperatura (*MAAk*), duas bombas peristálticas (*ISMATEC e LSTTATEC*), arca (*SANYO*).

## 3.3 Reagentes

### 3.3.1 Reagentes químicos

Água milipore (do sistema Milli-Q Gradient), a bacto-peptona, o *yeast nitrogen base* (YNB), e o extracto de levedura provieram da Difco (Detroit, MI, EUA). A

glucose e o peróxido de hidrogénio foram obtidos da Merck (Whitehouse Station, NJ). Os aminoácidos do meio de crescimento (arginina, metionina, tirosina, isoleucina, lisina, fenilalanina, valina, ácido aspártico, ácido glutâmico, triptofano, histidina, leucina, adenina, uracilo, treonina e serina) (SIGMA). O p-hidroxibenzoato de metilo (SIGMA-ALDRICH), o hidróxido de sódio (José M.Vaz Pereira).

### ❖ **Peróxido de hidrogénio**

Preparou-se a solução do peróxido de hidrogénio a partir de uma solução stock de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrada (~9M) guardada no frigorífico. Diluiu-se esta solução mãe em água destilada de modo a ter uma solução de 9 mM aproximadamente. Sabendo que a 240 nm a absorvidade molar do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é 43,4 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, o valor exacto da concentração foi determinado pela medição da absorvência aos 240 nm.

#### **3.3.2 Preparação do meio líquido de cultura sintético completo**

O meio de cultura utilizado foi o meio líquido de cultura sintético completo (sc) por não levar a formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ao invés do meio líquido completo YPD. O meio líquido sc tem a seguinte composição: Glucose 2% (m/v), YNB 6,85% (m/v), arginina 0,002% (m/v), metionina 0,002% (m/v), tirosina 0,003% (m/v), isoleucina 0,003% (m/v), lisina 0,003% (m/v), fenilalanina 0,005% (m/v), valina 0,015% (m/v), ácido aspártico 0,01% (m/v), ácido glutâmico 0,01% (m/v), triptofano 0,005% (m/v), histidina 0,01% (m/v), leucina 0,01% (m/v), adenina 0,0025% (m/v), uracilo 0,0025% (m/v), treonina 0,02% (m/v) e serina 0,04% (m/v).

#### **3.3.3 Preparação do meio sólido de cultura**

O meio sólido tem a seguinte composição: peptona 2% (m/v), extrato de levedura 1% (m/v), agar 2%, e glucose 2% (m/v). No meio sólido de glicerol a glucose é substituída pelo glicerol.

#### **3.3.4 Material Biológico**

A estirpe selvagem (*wild type*, wt) de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada ao longo do trabalho experimental foi a BY4741 (MATa; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0), e foi adquirida na *European Saccharomyces cerevisiae Archive For Functional Analysis* (EUROSCARF, Germany). As estirpes mutantes usadas no trabalho

experimental são isogénicas da estirpe wt encontrando-se descritas no quadro 3.1, tendo sido adquirida a estirpe ctt1 na EUROSCARF e a estirpe Δ5 foi gentilmente oferecida pelo Professor Dong-Yan Jin da universidade de Hong Kong, China.

**Quadro 3.1:** Estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* usadas no trabalho.

Designação	Estirpe	Genótipo
<b>Wt</b>	Y000000	BY4741; MAta; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0
<b>Ctt1</b>	Y04718	BY4741; MAta; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YKRO66C::KanMx4
<b>Δ5</b>	Y01402	BY4741; MAta; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; tsa1::KanMX4; tsa2::LEU2; prx1::URA3; ahp1::HIS3; dot 5::MET15

### **3.4 Determinação da constante de calibração do microcalorímetro de fluxo LKB 10700-1, e do volume efectivo da célula calorimétrica e tempo de residência com hidrólise do 4-hydroxibenzoato de metilo.**

Para determinar o **volume efectivo da célula calorimétrica**, o **tempo de residência** e a **constante de calibração do calorímetro**, acompanhou-se calorimetricamente a reacção de hidrólise do 4-hidroxibenzoato de metilo conforme descrito em (M. A. A. O'Neill, 2003). Inicialmente, foi obtida uma linha de base fazendo passar pelo calorímetro uma solução de NaOH a 0,50 mol.dm<sup>-3</sup>. Quando se atingiu uma linha de base relativamente estável, fez-se uma calibração eléctrica (o potencial eléctrico imposto é previamente seleccionado através do programa CBCAL 1.0). Terminada a calibração eléctrica o sinal regressa à linha de base. Assim após a estabilização deste pôde-se iniciar a reacção de hidrólise adicionando o 4-

hidroxibenzoato de metilo em pó ao NaOH numa concentração final de  $4,99 \times 10^{-5}$  mol.cm<sup>3</sup>. Após o término da reacção realiza-se uma nova calibração eléctrica.

### **3.5 Preparação da cultura de *Saccharomyces cerevisiae***

Para obtenção da cultura de células da levedura o seguinte procedimento foi realizado. A partir de células armazenadas numa arca com temperatura de - 80°C fez-se um riscado numa placa de Petri em meio sólido de glicerol. A partir deste riscado preparou-se a pré-cultura da seguinte forma: suspendeu-se uma amostra do riscado em 10 mL de meio sc, esta suspensão denominada de pré-cultura foi incubada a 30°C num agitador orbital HT modelo CH-4103 Bottmingen a uma velocidade de 160 rpm (durante a noite). Após este período, mediu-se a densidade óptica a 600 nm (OD<sub>600</sub>) da pré-cultura no espectrofotómetro Thermo Scientific modelo Genesys 10S UV-VIS (1 OD<sub>600</sub> ~  $3 \times 10^7$  células), inoculando posteriormente um determinado volume das células da pré-cultura, em meio líquido sc, por forma a obter uma determinada concentração de células inicial.

$$V(\text{pré} - \text{cultura}) = \frac{V(a \text{ inocular}) \times (OD \text{ desejado})}{(OD.\text{pré} - \text{cultura}) \times 2^{n^{\circ} \text{dupl}}} \quad (\text{equação 3.2})$$

O volume de pré-cultura a inocular é determinado segundo a equação 3.2 onde  $V_{(\text{pré-cultura})}$  é o volume de pré-cultura a utilizar,  $V_{(a \text{ inocular})}$  é o volume total da cultura a ser inoculado, OD<sub>desejado</sub>, a densidade óptica pretendida no início da experiência e OD<sub>(pré-cultura)</sub> o OD da pré-cultura a partir da qual será feita a nova cultura. O número de duplicações necessário para atingir OD<sub>desejado</sub> (nº de dupl) pode ser calculado tomando como base o tempo de duplicação da estirpe utilizada.

#### **3.5.1 Curvas de crescimento**

Para obter curvas de crescimento, utiliza-se a equação anterior assumindo que o nº duplicação é zero.

Após conhecer o volume de pré-cultura para obtenção de uma cultura com OD de 0,05 inoculava-se num balão com meio sc fora do sistema calorimétrico

desenvolvido e depois transferido para o reactor e colocado na incubadora do sistema LKB de fluxo (Figura 3.3). Nesse momento retirava-se o tubo de entrada que se encontrava mergulhado num outro reactor com meio sc utilizado, para recolha da linha de base inicial, e mergulhava-se imediatamente no reactor com a cultura.

### **3.5.2 Efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na cultura de leveduras**

Iniciam-se as leituras no calorímetro de fluxo com o meio de cultura sc, de modo a obter-se uma linha de base. Em seguida iniciam-se as medidas numa cultura de levedura na concentração desejada ( $OD_{600} = 0,25$ ) num erlenmeyer de 50 mL, contendo 20 mL da cultura de levedura. Após a estabilização da curva fez-se a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de modo que a concentração deste na cultura celular seja de 150  $\mu$ M. Posteriormente fizeram-se outras adições espaçadas entre si conforme indicado na apresentação dos resultados. As adições de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram feitas com uma bureta automática (Figura 3.13)



**Figura 3.13:** Bureta automática (CRISON 1S) utilizada para fazer adições de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **3.6 Análise da cultura de leveduras no microcalorímetro Thermal Activity Monitor (TAM)**

Após obtenção da cultura como descrito no ponto 3.5, 2 mL da mesma foram transferidos para uma célula de aço do par calorimétrico (secção 3.1.2), contendo a outra célula do par o mesmo volume de meio de cultura sc, e introduzido até a posição de pré-equilíbrio (Figura 3.11) no TAM. Esta posição foi mantida por cerca de 40 minutos e de seguida a célula calorimétrica (contendo a cultura) foi baixada até à posição de medição (Figura 3.11) e deixada estabilizar por uma hora, altura em que se iniciou a recolha do sinal. A adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é feita através de uma bureta automática (CRISON 4S). É de salientar que dentro da célula que contém a amostra existe um agitador no eixo para manter a cultura em agitação.

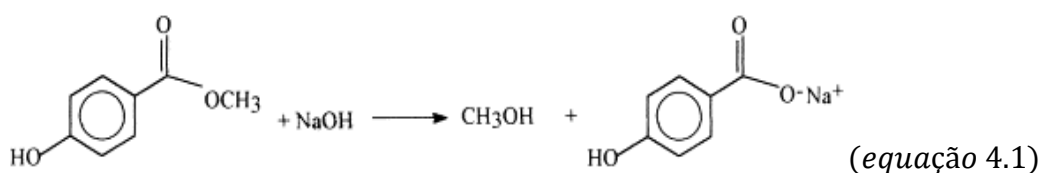


## 4 RESULTADOS

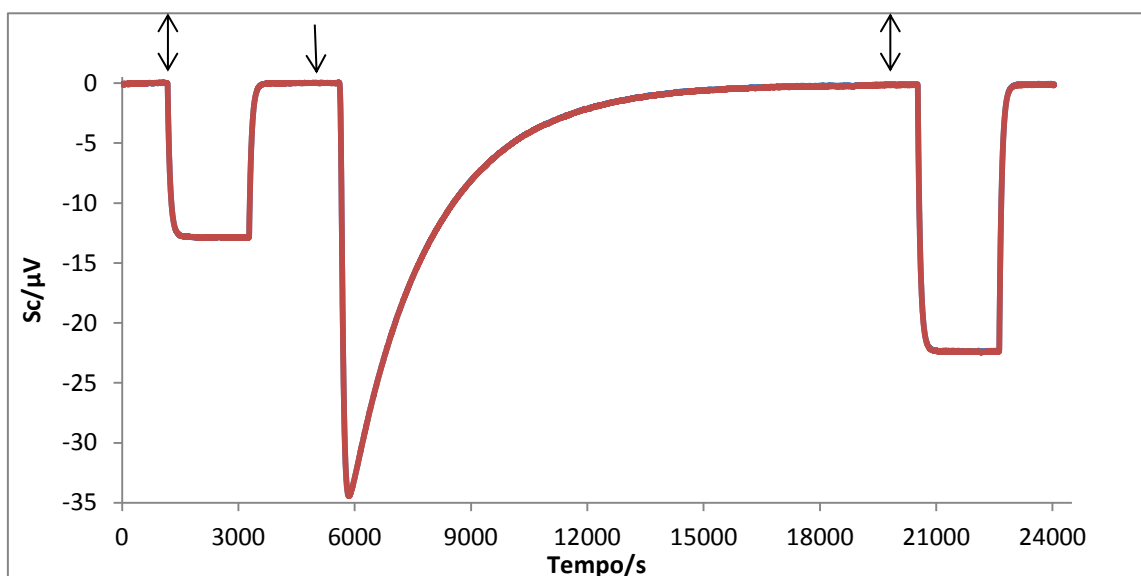
Nesta tese, aplica-se a técnica de microcalorimetria ao estudo dos efeitos do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células *Saccharomyces cerevisiae*. Apresentam-se em primeiro lugar os resultados que caracterizam o calorímetro de fluxo utilizado.

### 4.1 Determinação da constante de calibração do microcalorímetro de fluxo LKB 10700-1, e do volume efectivo da célula calorimétrica e tempo de residência com hidrólise do 4-hydroxibenzoato de metilo.

A constante de calibração foi determinada com base numa calibração eléctrica, enquanto a determinação do volume efectivo da célula de fluxo e o tempo de permanência dentro desta foram efectuadas com base na hidrólise do 4-hydroxibenzoato de metilo (equação 4.1) de acordo com o procedimento descrito em (M. A. A. O'Neill, 2003).



Uma experiência típica de calibração é mostrada na Figura 4.1.



**Figura 4.1:** Calibração eléctrica e reacção de hidrólise do 4-hidroxibenzoato de metilo numa solução de NaOH 0,5 M em função do tempo. São mostradas duas calibrações eléctricas realizadas com 100 e 130  $\mu\text{V}$ , respectivamente, indicadas pelas setas duplas. É mostrada ainda uma reacção de hidrólise do 4-hidroxibenzoato iniciada pela adição deste reagente (seta simples).

A **constante de calibração** do aparelho ( $\varepsilon$ ) foi calculada através da equação 4.2,

$$\varepsilon = \frac{P}{S_c} \text{ (equação 4.2)}$$

onde  $S_c$  é o deslocamento médio do sinal calorimétrico e  $P$  é a potência média dissipada pela resistência eléctrica dentro da célula calorimétrica ( $\text{J.s}^{-1}$ ) durante o tempo de calibração. A potência ( $P$ ) foi calculada através da seguinte equação:

$$P = \frac{\int_0^t VI dt}{t} \text{ (equação 4.3)}$$

onde,  $V$  e  $I$  representam a voltagem e a intensidade lidas num determinado intervalo de tempo ( $t$ ).

## Resultados

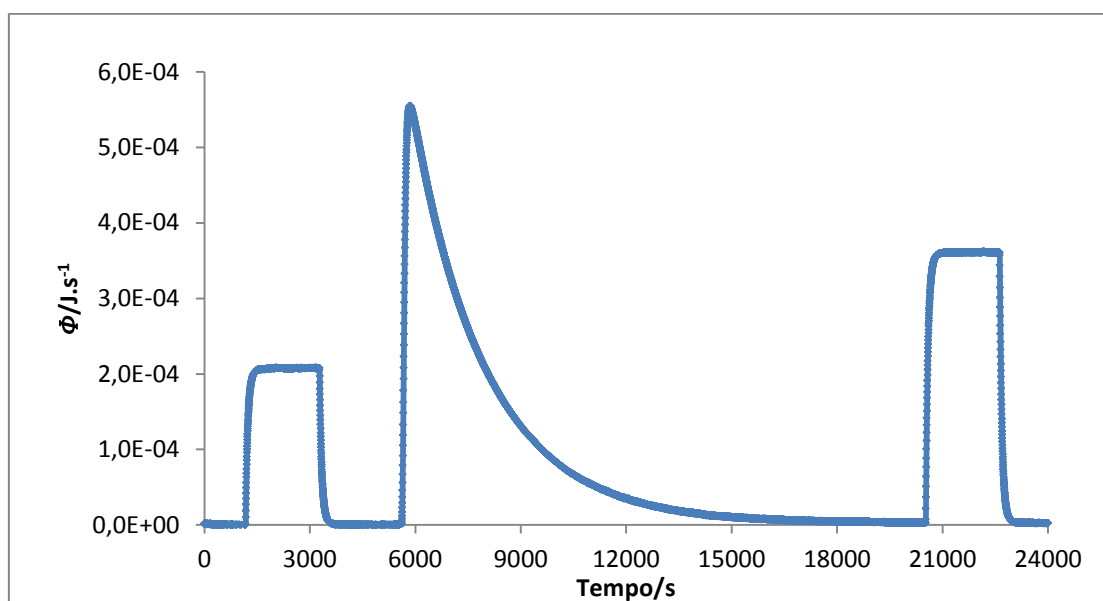
Com o valor médio da constante de calibração, calculou-se o fluxo de calor,  $\Phi$  (W) dissipado pelo sistema segundo a equação 4.4.

$$\Phi = \varepsilon \times Volt \text{ (equação 4.4)}$$

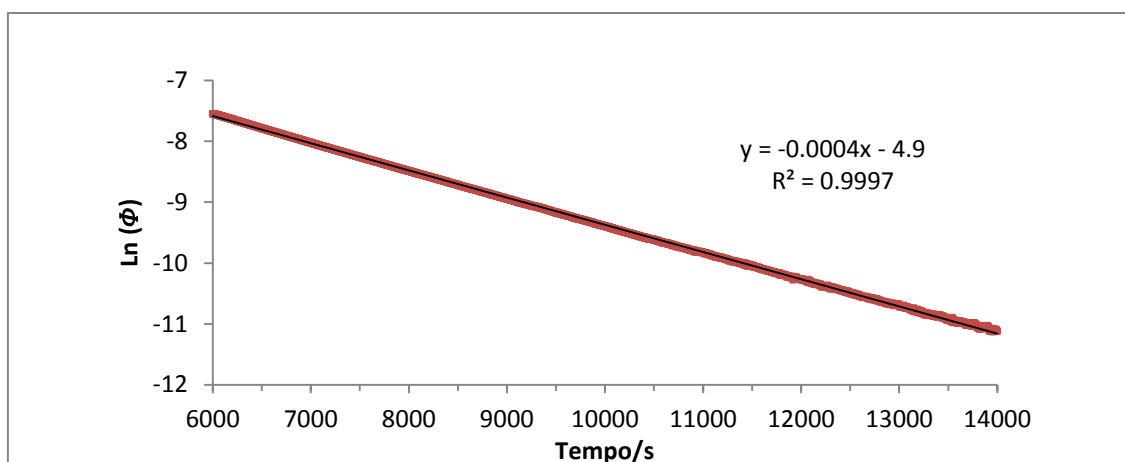
**Quadro 4.1:** Resultados das duas calibrações eléctrica relativa a experiencia representada na Figura 4.1.

Calibração	Voltagem	Variação da tensão	Potência		Constante de calibração
	$\mu V$	$S_c / \mu V$	$P / (J.s^{-1})$	$P / (\mu W)$	$\varepsilon / \mu W \cdot \mu V^{-1}$
1	100	12,84	$2,07 \times 10^{-4}$	207,0	16,12
2	130	22,19	$3,57 \times 10^{-4}$	357,0	16,09

Os valores da tensão eléctrica podem ser agora convertidos em potência dissipada (Figura 4.2). De seguida usa-se a reacção de hidrólise do 4-hidroxibenzoato de metilo para calcular o volume da célula de fluxo e o tempo de residência.



**Figura 4.2:** Calor libertado ( $J.s^{-1}$ ) em função do tempo da reacção de hidrólise do 4-hidroxibenzoato de metilo.



**Figura 4.3:** Linearização da energia térmica dissipada ( $J.s^{-1}$ ) durante a reacção de hidrólise do 4-hidroxibenzoato de metilo em função do tempo (s).

Da linearização da energia térmica dissipada em função do tempo durante a hidrólise do 4-hidroxibenzoato de metilo (Figura 4.3) obteve-se a equação ( $\ln(\Phi) = -4,0 \times 10^{-4} \times t - 4,9$ ). Através dela calculou-se a potência inicial (início da reacção de hidrólise) em  $8,27 \times 10^{-4} W$ . O tempo de residência da solução na célula calorimétrica foi determinada pela equação 4.5, onde  $F$  é a taxa de fluxo,  $C$  é a concentração de 4-hidroxibenzoato de metilo,  $H$  a entalpia e  $k$  a constante de 1ª ordem da reacção. Do trabalho (M. A. A. O'Neill, 2003) sabe-se que o valor de  $\Delta H$  da reacção de hidrólise do 4-hidroxibenzoato de metilo é  $-50 kJ.mol^{-1}$  e que a constante  $k$  é igual a  $7,27 \times 10^{-4} s^{-1}$  a 303 K. O fluxo utilizado foi de  $0,0183 cm^3.s^{-1}$  e a concentração de 4-hidroxibenzoato de metilo foi  $5,0669 \times 10^{-5} mol.cm^{-3}$ . Conhecidos todos os parâmetros para a determinação do tempo de residência ( $\tau$ ), o mesmo foi determinado.

$$\tau = \frac{\ln\left(1 - \left(\frac{\Phi_0}{F \times C \times \Delta H}\right)\right)}{-k} \quad (\text{equação 4.5})$$

Para obtenção do volume efectivo, multiplicou-se o valor do tempo de residência ( $\tau$ ) pela taxa de fluxo ( $F$ ), equação 4.6.

$$V_c = \tau \times F \quad (\text{equação 4.6})$$

Os valores das várias experiências para estes parâmetros encontram-se resumidos no quadro 4.2.

**Resultados**

**Quadro 4.2** Resultados obtidos para a constante de calibração ( $\epsilon$ ), o volume efectivo ( $V_c$ ) e o tempo de residência ( $\tau$ ) para várias experiências independentes.

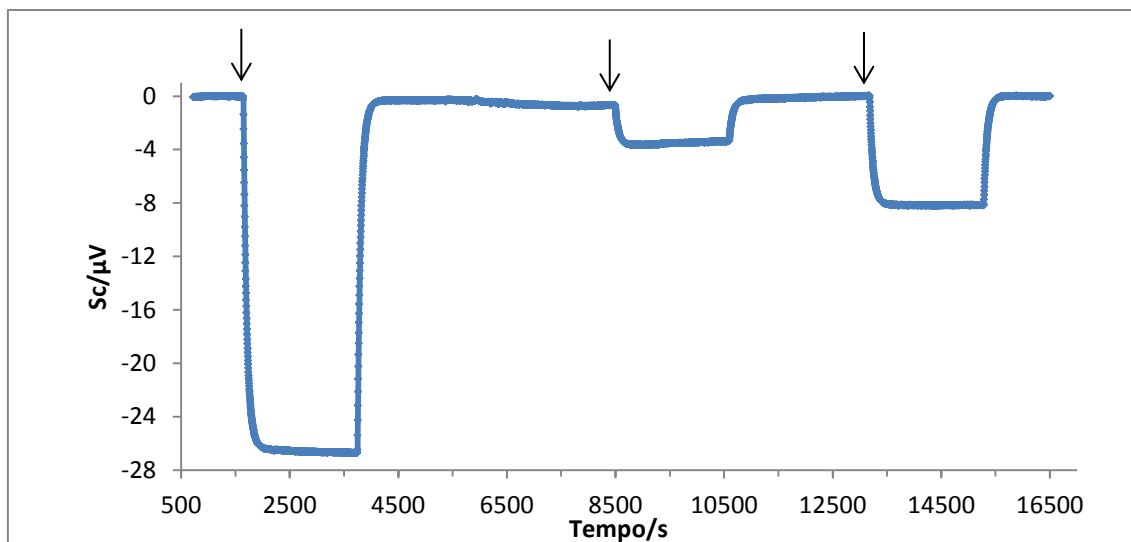
Experiência	$\epsilon/\mu\text{W}.\mu\text{V}^{-1}$	$V_c/\text{cm}^3$	$\tau/\text{s}$
1	15,8	0,43	25,6
2	15,7	0,36	21,2
3	16,8	0,42	25,1
4	16,1	0,45	24,5
5	15,4	0,42	25,3
6	16,3	0,37	22,0
7	15,9	0,41	24,6
<b>Média</b>	16,0	0,41	23,8
<b>Desvio padrão</b>	0,5	0,03	1,7

Da análise do quadro 4.2 conclui-se que: (1) a célula calorimétrica do microcalorímetro (LKB-10700-1) tem um volume efectivo médio de  $0,41 \pm 0,03 \text{ cm}^3$  e que o meio reaccional ou a cultura de células permanece dentro da célula calorimétrica em média  $23,8 \pm 1,7 \text{ s}$  quando é imposto um fluxo de  $0,0183 \text{ cm}^3.\text{s}^{-1}$ .

## 4.2 Calibração eléctrica no meio de cultura sintético completo (sc).

Fizeram-se ainda algumas calibrações eléctricas com o meio de cultura sc. Na Figura 4.4 é ilustrada uma experiência típica, sendo os resultados de várias experiências mostrados no quadro 4.3 Estes resultados são próximos dos obtidos na secção anterior.

**Estudo Calorimétrico do efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae***  
**Resultados**



**Figura 4.4:** Calibrações eléctricas no meio de cultura sc variando a intensidade aplicado à resistência. Três calibrações sequenciais estão indicadas pelas setas e foram feitas com 145, 50 e 80  $\mu\text{V}$ , respectivamente.

**Quadro 4.3** Constantes de calibração obtida em cinco experiencias independentes com meio sc.

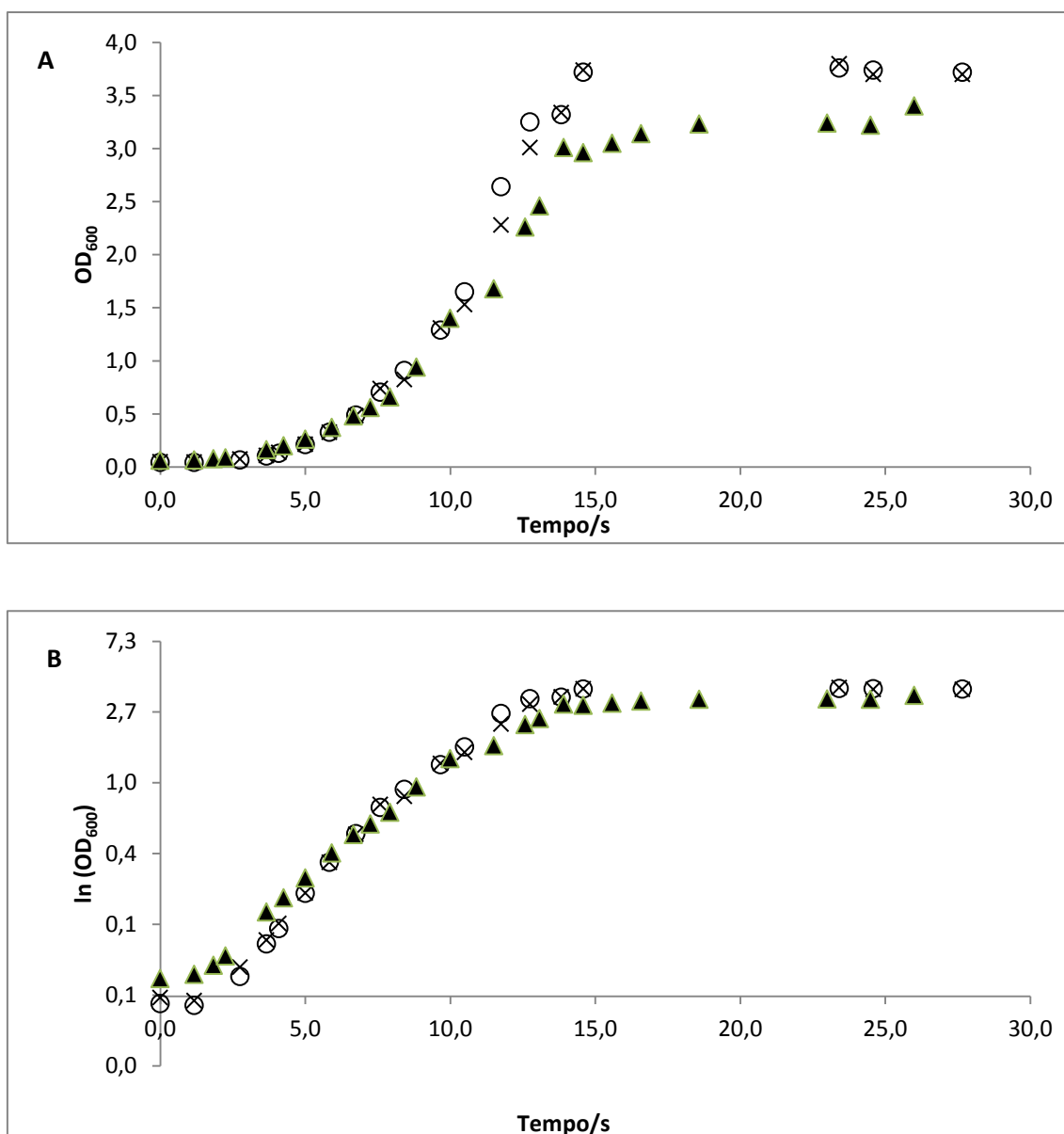
Experiencia	Voltagem	Variação da tensão	Potencia		Constante de calibração
	$\mu\text{V}$	$S_c/\mu\text{V}$	$P/(\text{J}\cdot\text{S}^{-1})$	$P/(\mu\text{W})$	$\varepsilon/\mu\text{W}\cdot\mu\text{V}^{-1}$
1	145	28,05	$4,41\times10^{-04}$	441,0	15,7
2	145	26,34	$4,42\times10^{-04}$	442,0	16,7
3	145	26,85	$4,41\times10^{-04}$	441,0	16,4
4	145	28,72	$4,41\times10^{-04}$	440,5	15,3
5	145	27,72	$4,405\times10^{-04}$	440,5	15,9
6	50	3,19	$5,11\times10^{-05}$	51,1	16,0
7	80	8,16	$1,35\times10^{-04}$	135,0	16,50
Média					<b>16,0</b>
Desvio					0,5
Padrão					

Conclui-se assim que a constante de calibração obtida em meio sc é idêntica dentro do erro experimental à obtida em solução de NaOH 0,5 M. Conhecendo já a constante de calibração, o tempo de residência e o volume efectivo do microcalorímetro, estão criadas as condições para analisar a actividade metabólica da *Saccharomyces cerevisiae* por calorimetria de fluxo.

#### **4.3 Comparação das curvas de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* seguidas por densidade óptica e calorimetria**

Começou-se por acompanhar o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* seguindo a sua densidade óptica de modo a obter curvas de crescimento das três estirpes utilizadas neste trabalho. Uma das formas de acompanhar o crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* é seguir a sua variação da densidade óptica. Estudos realizados anteriormente mostram que 1 OD<sub>600</sub> (densidade óptica a medida a 600 nm) corresponde a  $3 \times 10^7$  células no volume de 1 mL (comunicação oral). Portanto sabendo a densidade óptica da cultura é possível estimar o número de células da cultura.

**Estudo Calorimétrico do efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae***  
**Resultados**



**Figura 4.5:** Curva de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae*, estirpe wt (○), estirpe Ctt1 (×) e estirpe 5Δ (▲). A OD<sub>600</sub> inicial foi de 0,05, mostrando-se em B os resultados obtidos em escala logarítmica.

As curvas de crescimentos obtidas (Figura 4.5) permitiram identificar as três fases de crescimento característico da levedura. A fase inicial corresponde à fase lag, a fase de adaptação das células ao meio. Nesta fase, observa-se um crescimento lento, ao contrário da fase seguinte onde o número de células cresce exponencialmente com



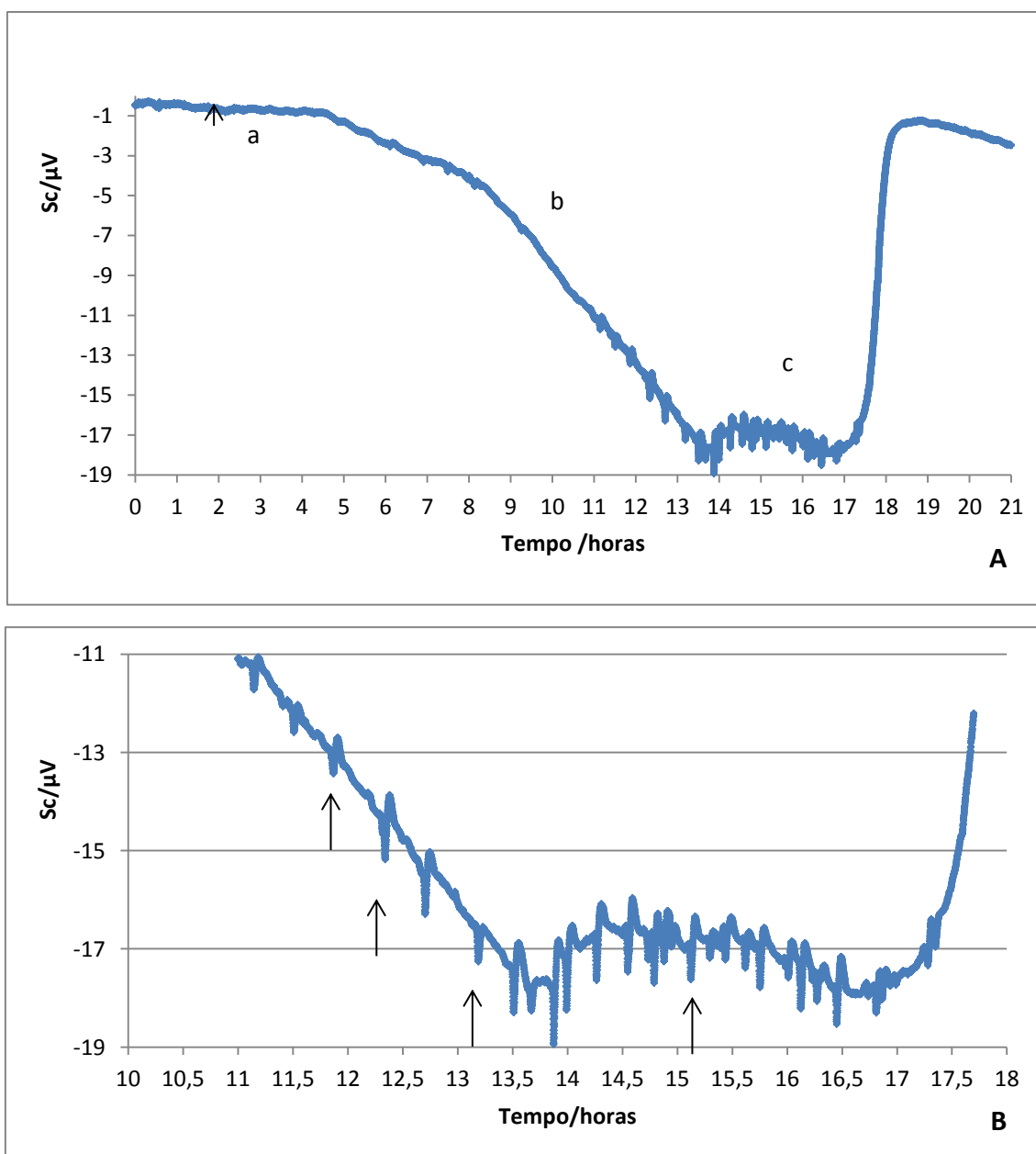
### **Resultados**

o tempo; por fim a fase estacionária onde o crescimento da cultura pára. De notar ainda a fase pós-diáuxica referente à transição entre fase exponencial e estacionária.

Os resultados mostram que a estirpe selvagem (wt) e a estirpe com deleção do gene do catalase citosólico (ctt1) têm um crescimento semelhante, apresentando o mesmo tempo de duplicação. Nas condições em que foram traçadas as curvas, meio de cultura sc e OD<sub>600</sub> inicial de 0,05, a fase estacionária é atingida em aproximadamente 15 horas. A estirpe com deleções nas cinco peroxirredoxinas ( $\Delta 5$ ) tem um crescimento parecido com as duas anteriores, porém ligeiramente mais lenta, levando aproximadamente 16 horas até que se atinja a fase estacionária.

De seguida, observou-se por calorimetria a actividade metabólica das três estirpes ao longo das curvas de crescimento. Inoculou-se com células o meio sc que já se encontrava em fluxo no calorímetro de modo a que o OD<sub>600</sub> inicial fosse de 0,05.

*Estudo Calorimétrico do efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no metabolismo da Saccharomyces cerevisiae*  
**Resultados**

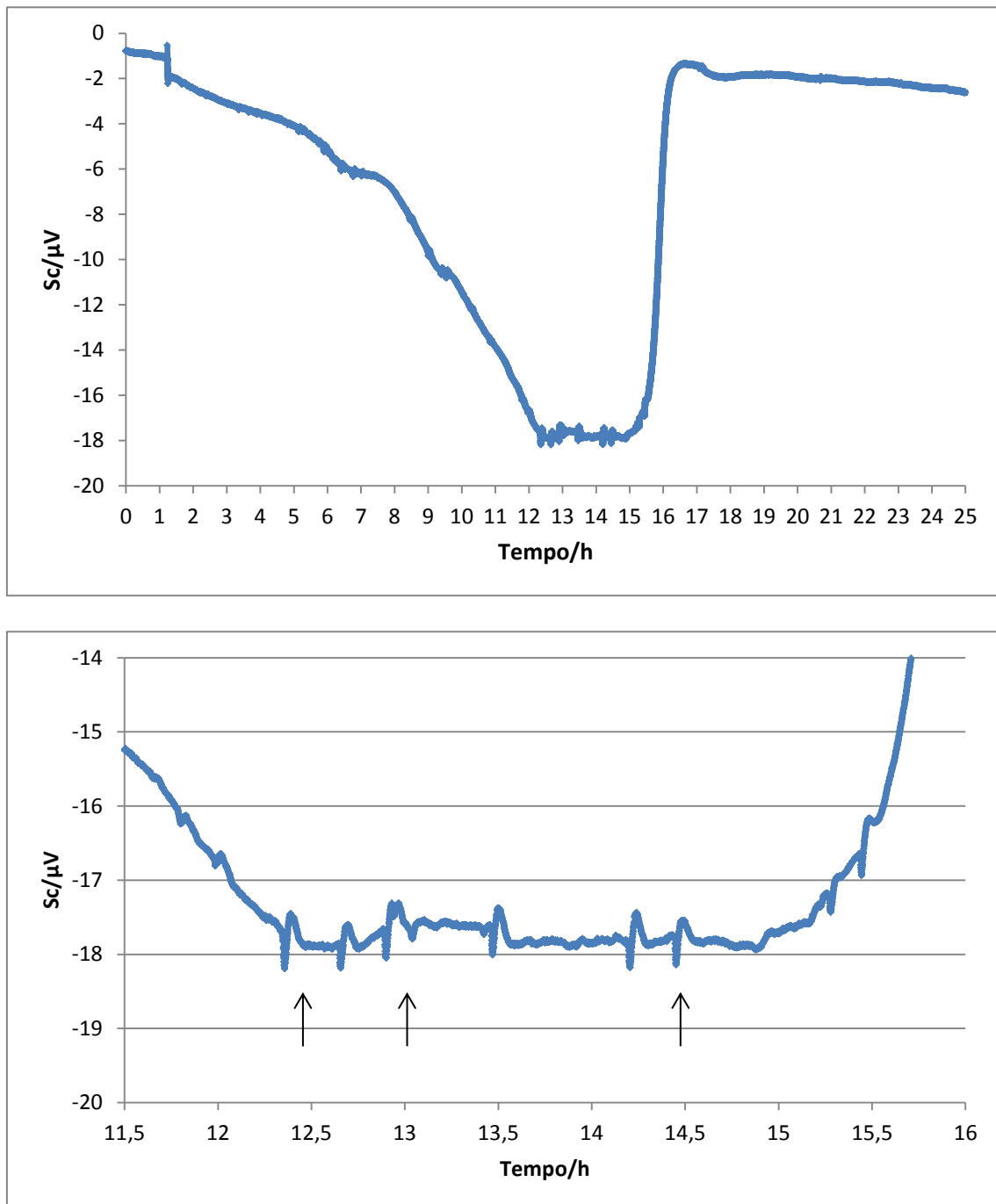


**Figura 4.6:** (A) Curva de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae*, estirpe selvagem (wt) By4741 acompanhado por microcalorimetria. A adição da cultura de células ocorreu aos 103 minutos, isto é, a volta de 1,72 horas (indicada pela seta pequena). Nota-se as 3 principais fases de crescimento característico da cultura. As fases a, b e c correspondem as fases lag, exponencial e estacionária respectivamente. (B) Ampliação da Figura A para evidenciar oscilações metabólicas na fase pós-diauxica e estacionária (setas).

A Figura 4.6 mostra uma curva de crescimento típica da estirpe selvagem, sendo possível identificar as três fases de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae*. Comparando esta curva, com a obtida anteriormente seguindo a densidade óptica (Figura 4.5) é visível alguma concordância dos resultados obtidos com estes dois métodos, observando-se embora uma muito maior complexidade de comportamentos na curva da actividade metabólica. A fase lag é bem visível nos dois métodos, tendo uma duração entre 2-3 h. A segunda fase de crescimento é caracterizada por uma maior variação do sinal calorimétrico, notando-se uma alteração do declive deste aproximadamente às 8 h, a meio da fase exponencial. Esta alteração não tem correspondência na densidade óptica. O fim da fase exponencial, aproximadamente às 11 h observado na Figura 4.5, é caracterizado pelo aparecimento de oscilações periódicas na curva calorimétrica. Estas oscilações apareceram em todas as experiências da curva de crescimento, mostrando assim que elas são genuínas. Poder-se-á especular que essas oscilações são devidas à regulação das vias metabólicas ajustando o metabolismo consoante a disponibilidade de nutrientes, característica da fase pós-diauxica referente à transição entre fase exponencial e estacionária. Tais oscilações podem reflectir a alteração do substrato (fonte preferencial de carbono) utilizado para obtenção de energia, como exemplo mudança de glicose para etanol. É interessante registar as grandes variações calorimétricas observadas na fase estacionária, revelando uma riqueza de comportamentos metabólicos que não é visível quando se regista a densidade óptica.

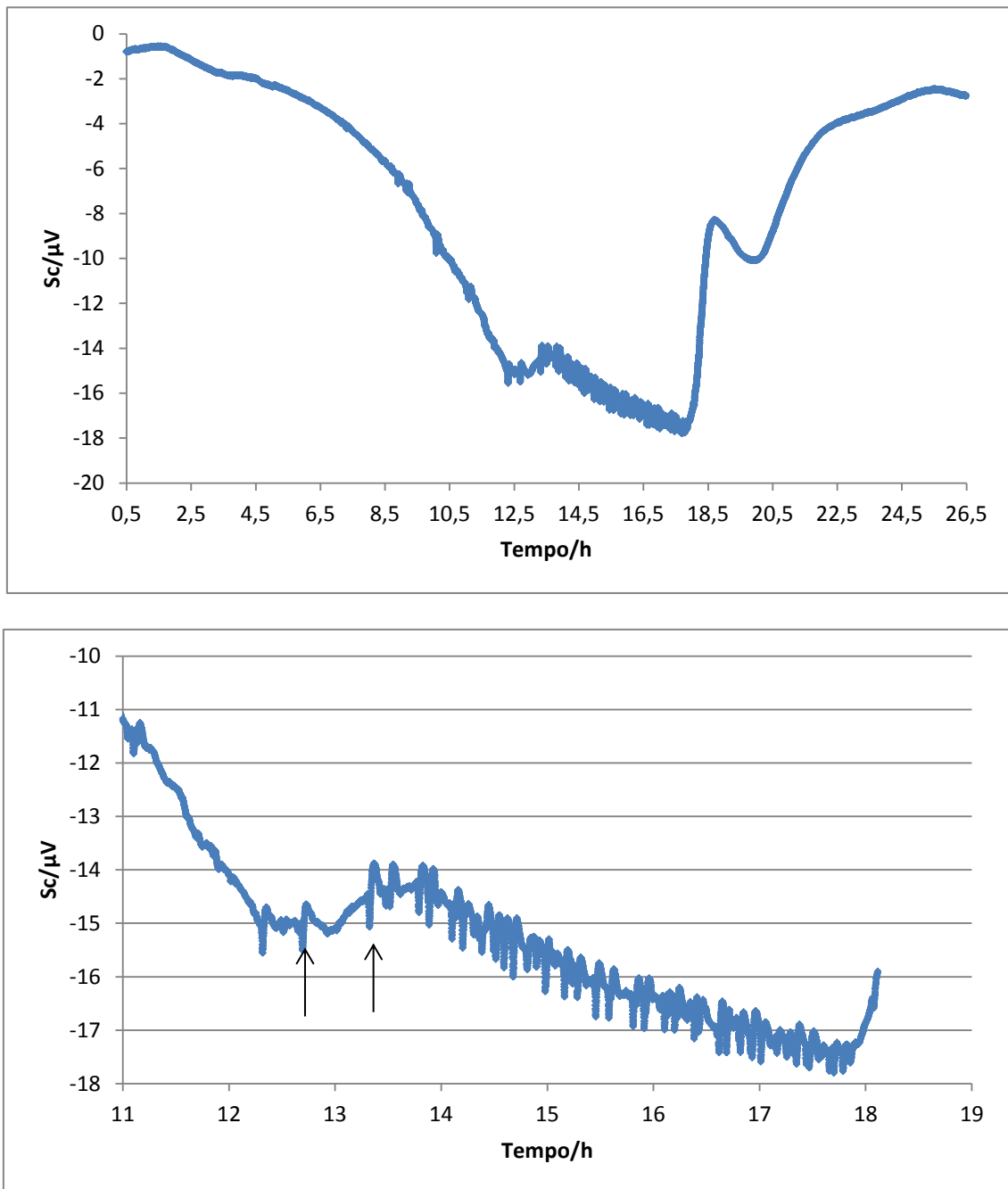
O perfil típico observado para as estirpes com deleção do gene do catalase citosólico (*ctt1*) (Figura 4.7) e com deleção das cinco peroxirredoxinas ( $\Delta 5$ ) (Figura 4.8) foi semelhante ao observado para a estirpe selvagem.

*Estudo Calorimétrico do efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no metabolismo da Saccharomyces cerevisiae*  
**Resultados**



**Figura 4.7:** (Superior) Curva de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae*, estirpe com deleção da catalase (*ctt1*) By4741 acompanhado por microcalorimetria. (Inferior) Ampliação da Figura superior onde evidencia oscilações metabólicas na fase pós-diauxica e estacionária (setas).

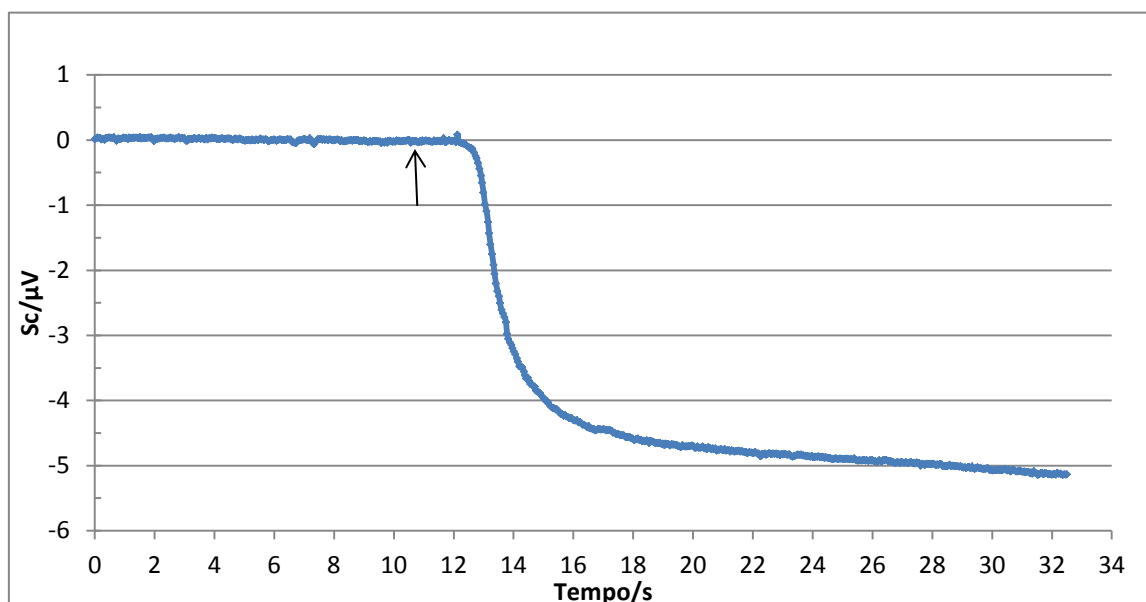
*Estudo Calorimétrico do efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae**  
**Resultados**



**Figura 4.8:** (Superior) Curva de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae*, estirpe com deleção das cinco peroxirredoxinas ( $\Delta 5$ ) By4741 acompanhado por microcalorimetria. (Inferior) Ampliação da Figura A onde evidencia oscilações metabólicas na fase pós-diauxica e estacionária (setas).

#### 4.4 Potencia dissipada pela *Saccharomyces cerevisiae* na fase exponencial

Estudou-se a potência dissipada pela *Saccharomyces cerevisiae* na fase exponencial das diferentes estirpes utilizadas neste trabalho. Uma experiência típica é mostrada na Figura 4.9. Esta figura também evidencia o tempo de atraso existente entre adição da cultura de células ao calorímetro e o aparecimento do sinal correspondente a cultura. Este tempo de atraso é aproximadamente dois minutos no fluxo utilizado.



**Figura 4.9:** Resposta calorimétrica à adição da cultura de *Saccharomyces cerevisiae* na fase exponencial de crescimento. A seta indica a adição de células da estirpe selvagem (0,264 OD<sub>600</sub>) ao calorímetro.

A potência dissipada é obtida a partir de.

$$P_o/\mu J.s^{-1} = \mathcal{E}/\mu J.s^{-1}.\mu V \times S_c/\mu V \text{ (equação 4.7)}$$

onde  $P_o$  é a potência dissipada,  $\mathcal{E}$  a constante de calibração do calorímetro e  $S_c$  sinal calorimétrico obtido pela adição da cultura de células (Figura 4.9). A potência calculada desta forma deve ser normalizada pelo número de células:

$$P_o/cel = P_o/n^{\circ}células(Cel_{calorimétrica}) \text{ (equação 4.8)}$$

onde  $P_o/cel$  é a potência dissipada por célula,  $P_o$  a potência total dissipada,  $n^{\circ} células$  ( $Cel_{calorimétrica}$ ) o número de células da levedura dentro da célula calorimétrica. Este último é determinado pela equação 4.9.

$$n^{\circ}células(Cel_{calorimétrica}) = V_{cel\ calorimétrica} \times C^{\circ} \frac{células}{ml} \text{ (equação 4.9)}$$

Onde,  $V_{cel\ calorimétrica}$  é o volume efectivo da célula calorimétrica (determinada anteriormente) e  $C^{\circ} células/ml$  o número de células de levedura por  $cm^3$ . Sabendo que 1 OD<sub>600</sub> corresponde a  $3 \times 10^7$  células em  $1\ cm^3$ , o número de células ( $C^{\circ} células/ml$ ) presentes na cultura é encontrada multiplicando o OD<sub>600</sub> da mesma por  $3 \times 10^7$  (equação 4.10).

$$C^{\circ} células/ml = OD \times 3 \times 10^7 \text{ (equação 4.10)}$$

A potência dissipada pelas três estirpes da levedura utilizada é igual entre si dentro do erro experimental (quadros 4.4, 4.5 e 4.6). Poder-se-ia pensar que a estirpe com deleção do gene do catalase ou com as deleções das peroxirredoxinas tivessem uma menor actividade metabólica, porém tal não acontece.

**Quadro 4.4:** Valores experimentais da potência dissipada por células da estirpe selvagem da *S. cerevisiae*.

DADOS EXPERIMENTAIS - Potencia dissipada pela cultura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> estirpe selvagem					
n	OD	$C_{\text{yeast}}^{\circ}/\text{cells}\cdot\text{cm}^{-3}$	Nº de células na célula calorimétrica	$P_o/pJ\cdot s^{-1}\cdot\text{célula}$ calorimétrica	$P_o/pJ\cdot s^{-1}\cdot\text{cell}^{-1}$
1	0,264	$7,92\times 10^6$	$3,26\times 10^6$	$6,93\times 10^7$	21,4
2	0,255	$7,65\times 10^6$	$3,13\times 10^6$	$7,24\times 10^7$	23,1
3	0,242	$7,26\times 10^6$	$2,97\times 10^6$	$6,76\times 10^7$	22,8
4	0,230	$6,90\times 10^6$	$2,82\times 10^6$	$5,48\times 10^7$	19,4
5	0,226	$6,78\times 10^6$	$2,78\times 10^6$	$5,71\times 10^7$	20,6
6	0,240	$7,20\times 10^6$	$2,95\times 10^6$	$5,61\times 10^7$	19,0
7	0,230	$6,90\times 10^6$	$2,82\times 10^6$	$6,40\times 10^7$	22,7
8	0,201	$6,03\times 10^6$	$2,47\times 10^6$	$4,91\times 10^7$	19,9
<b>Média</b>					<b>21,1</b>
<b>D.Padrão</b>					<b>1,6</b>



**Estudo Calorimétrico do efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae***  
**Resultados**

**Quadro 4.5:** Valores experimentais da potência dissipada por células da estirpe com deleção do gene da catalase da *S. cerevisiae*.

DADOS EXPERIMENTAIS - Potencia dissipada pela cultura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> estirpe ctt1					
N	OD	$C_{\text{yeast}}^{\circ}/\text{cells}\cdot\text{cm}^{-3}$	Nº de células na célula calorimétrica	$P_o/\text{pJ}\cdot\text{s}^{-1}/\text{célula}$ calorimétrica	$P_o/\text{pJ}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{cell}^{-1}$
1	0,253	$7,59\times 10^6$	$3,11\times 10^6$	$5,94\times 10^7$	19,1
2	0,218	$6,54\times 10^6$	$2,68\times 10^6$	$5,95\times 10^7$	22,2
3	0,251	$7,53\times 10^6$	$3,086\times 10^6$	$6,02\times 10^7$	19,5
4	0,213	$6,39\times 10^6$	$2,62\times 10^6$	$4,42\times 10^7$	16,9
5	0,215	$6,45\times 10^6$	$2,64\times 10^6$	$5,38\times 10^7$	20,4
6	0,25	$7,50\times 10^6$	$3,07\times 10^6$	$5,84\times 10^7$	19,0
7	0,228	$6,84\times 10^6$	$2,80\times 10^6$	$6,48\times 10^7$	23,1
<b>Média</b>					<b>20,0</b>
<b>D.Padrão</b>					<b>2,1</b>

**Quadro 4.6:** Valores experimentais da potência dissipada por células da estirpe com deleções das cinco peroxirredoxinas da *S cerevisiae*.

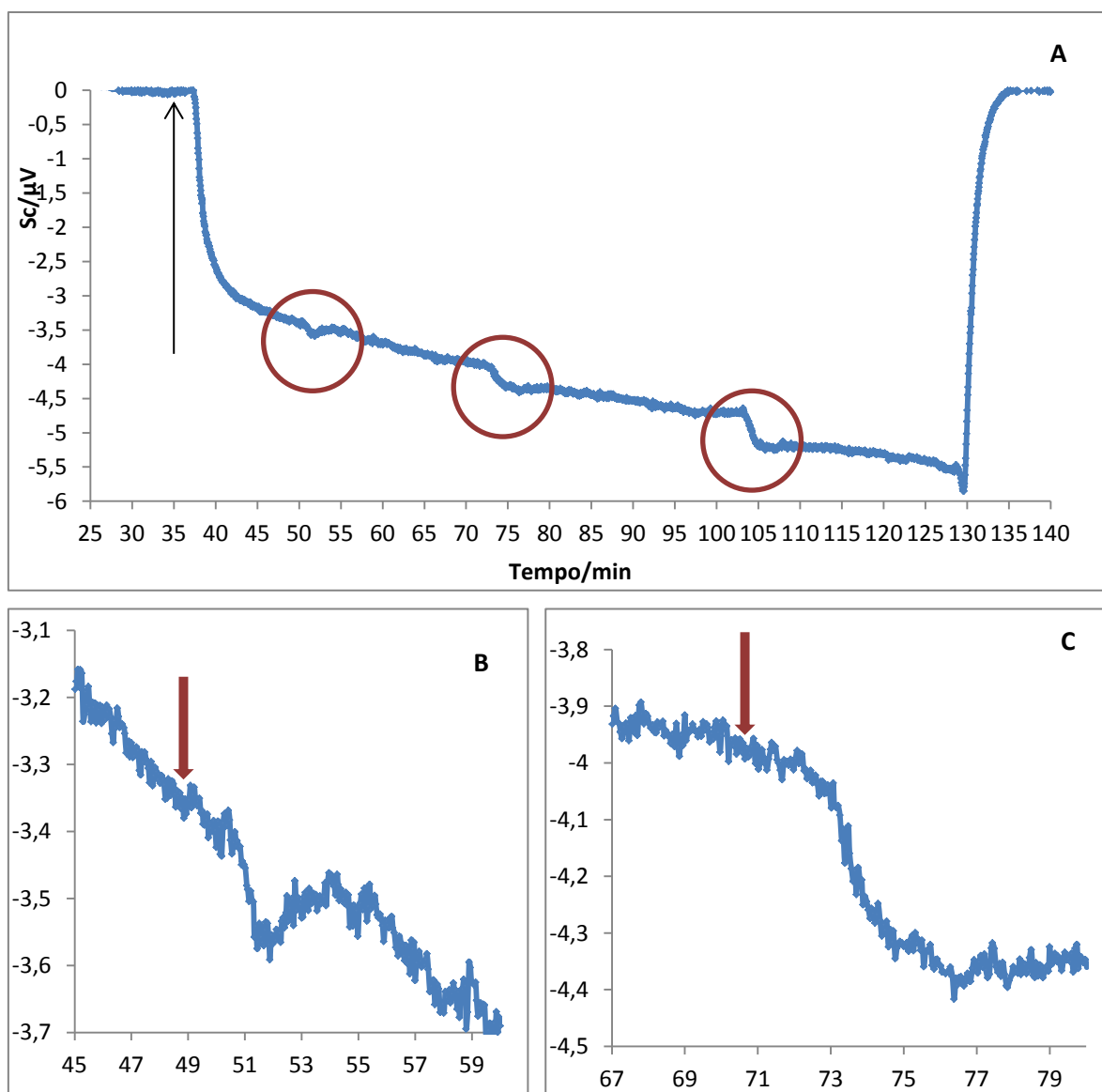
DADOS EXPERIMENTAIS - Potencia dissipada pela cultura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> estirpe 5Δ					
n	OD	$C_{\text{yeast}}/\text{cells}\cdot\text{cm}^{-3}$	Nº de células na célula calorimétrica	$P_o/\text{pJ}\cdot\text{s}^{-1}/\text{célula}$ calorimétrica	$P_o/\text{pJ}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{cell}^{-1}$
1	0,216	$6,48\times 10^6$	$2,65\times 10^6$	$5,70\times 10^7$	21,5
2	0,24	$7,20\times 10^6$	$2,95\times 10^6$	$5,76\times 10^7$	19,5
3	0,095	$2,85\times 10^6$	$1,17\times 10^6$	$1,11\times 10^7$	9,5
4	0,252	$7,56\times 10^6$	$3,09\times 10^6$	$5,94\times 10^7$	19,2
5	0,231	$6,93\times 10^6$	$2,84\times 10^6$	$5,30\times 10^7$	18,7
6	0,244	$7,32\times 10^6$	$3,00\times 10^6$	$5,49\times 10^7$	18,3
7	0,286	$8,58\times 10^6$	$3,51\times 10^6$	$7,15\times 10^7$	20,4
Média					18,2
Desvio Padrão					3,9

#### **4.5 Estudo do efeito do peróxido de hidrogénio no metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae* nas diferentes estirpes**

O efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no metabolismo da levedura foi estudado na fase exponencial, mostrando-se resultados representativos nas Figura 4.10, Figura 4.11 e Figura 4.12, respectivamente para a estirpes selvagem, deletada no gene do catalase citosólico, e na deletada em genes de cinco peroxirredoxinas.

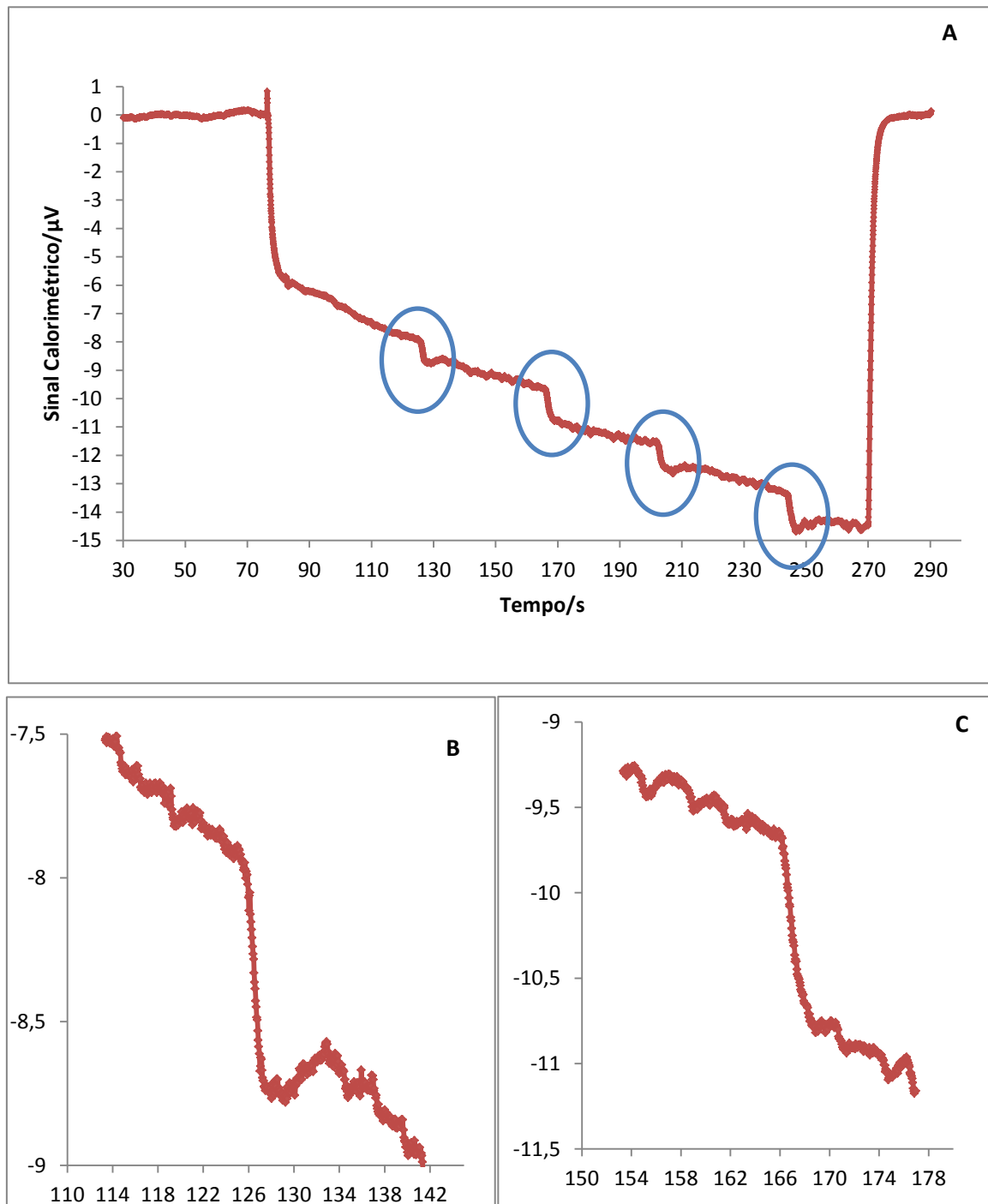
Os estudos calorimétricos permitem-nos detectar variações metabólicas em resposta ao oxidante introduzido no meio. Em geral há uma resposta diferente em relação à primeira, à segunda, e à terceira adições. Na primeira adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas estirpes selvagens (wt) e com deleção do gene do catalase (ctt1) há uma queda no valor da potência que de seguida faz um pequeno “ombro” antes de continuar a variar com o declive anterior. Nas adições subsequentes tal “ombro” não é observado e após a queda da potência o declive anterior à adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é retomado. Este resultado sugere uma adaptação da cultura a este oxidante. Analisando a resposta calorimétrica das estirpes wt e ctt1 à adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não se detectam diferenças significativas. Embora o catalase seja importante na resposta ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as células possuem outros mecanismos que permitem eliminar o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A resposta à adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à estirpe com deleções nas cinco peroxirredoxinas ( $\Delta 5$ ) foi muito mais lenta. Esta estirpe após a agressão com uma dose de 150  $\mu$ M demora mais tempo a recomeçar o declive normal de crescimento sem a adição. Este resultado sugere uma grande importância das peroxirredoxinas na defesa ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

*Estudo Calorimétrico do efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no metabolismo da Saccharomyces cerevisiae*  
**Resultados**



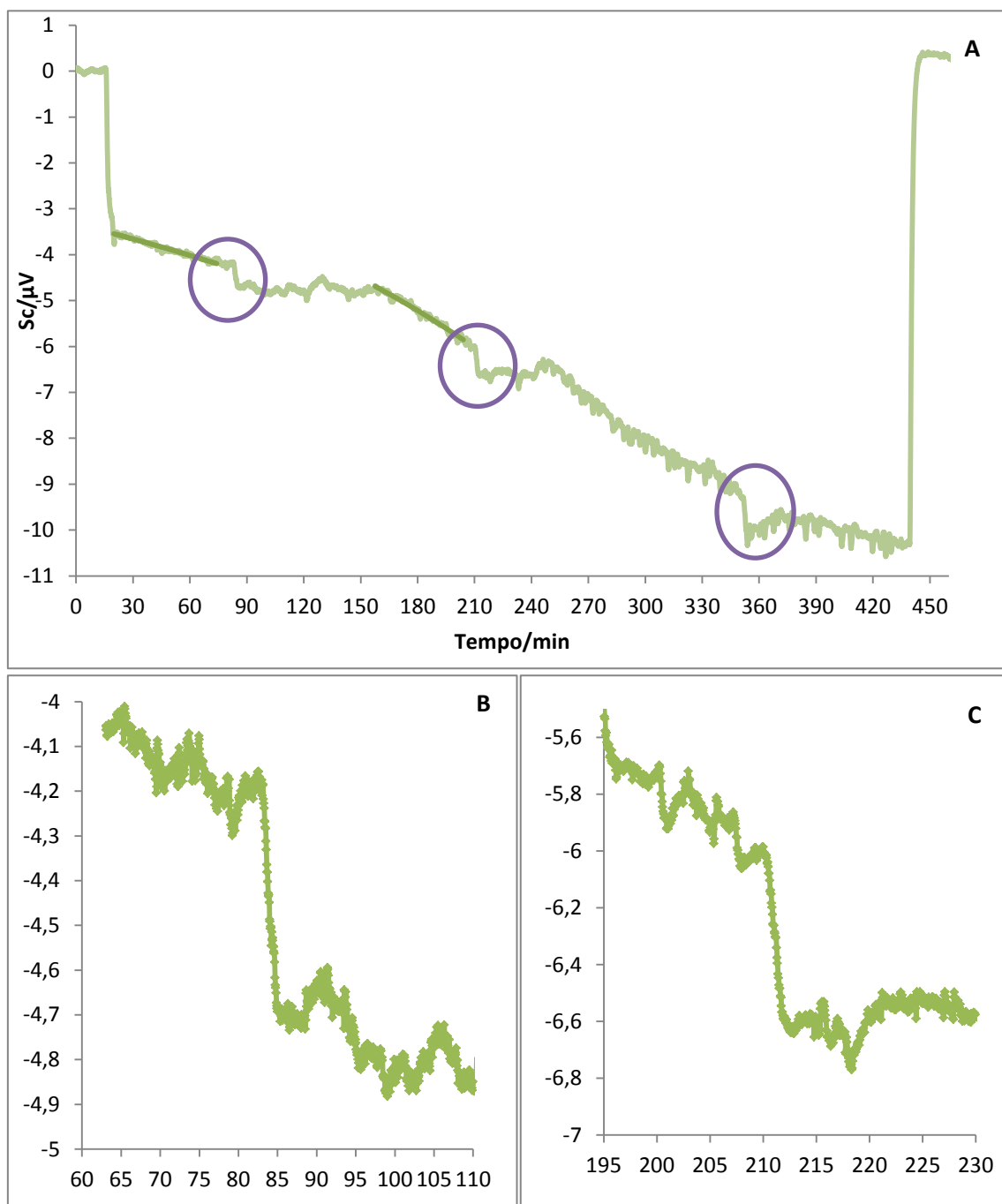
**Figura 4.10:** Perfil característico da adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à cultura de *Saccharomyces cerevisiae* (estirpe selvagem, wt). (A) A Figura mostra 3 adições bolus de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 μM (círculos) e a seta o tempo da adição da cultura (OD<sub>600</sub>=0,25); (B e C) mostram uma ampliação da primeira e segunda adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respectivamente. As setas indicam a adição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na cultura. O intervalo de tempo entre a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a alteração do sinal calorimétrico reflecte o tempo que a cultura demora a chegar à célula calorimétrica. Este tempo de atraso é aproximadamente 2 minutos quando o fluxo é de 1.0 mL/min.

*Estudo Calorimétrico do efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no metabolismo da Saccharomyces cerevisiae*  
**Resultados**



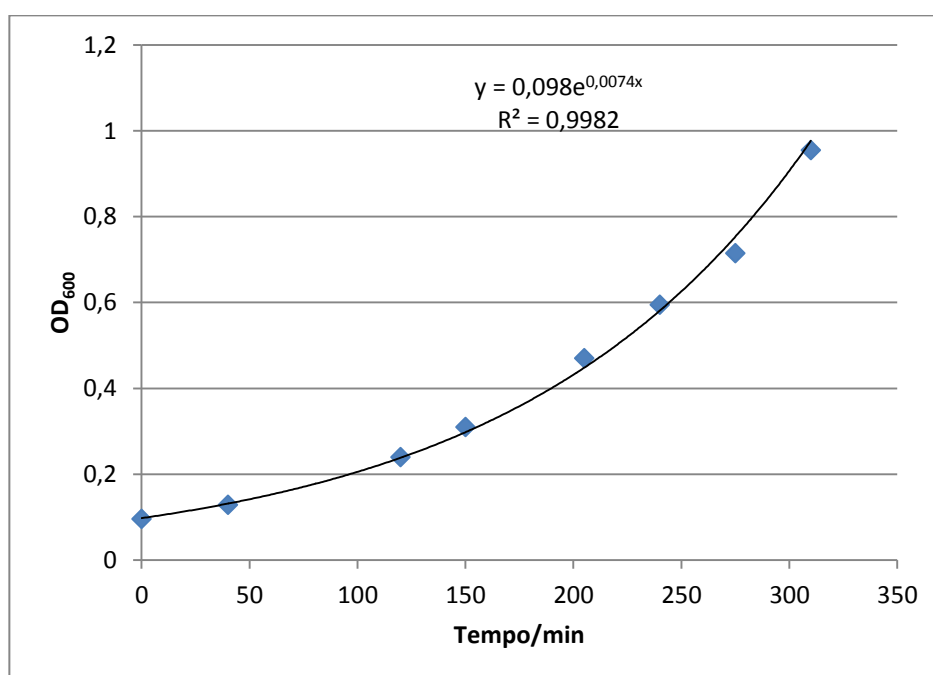
**Figura 4.11:** Perfil característico da adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a cultura de *saccharomyces cerevisiae* (BY4741-ctt1) analisada calorimetricamente no microcalorímetro de fluxo LKB-10-700. (A). A Figura mostra as 4 adições de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nos círculos, (B e C) mostram uma ampliação da primeira e segunda adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respectivamente.

*Estudo Calorimétrico do efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no metabolismo da Saccharomyces cerevisiae*  
**Resultados**



**Figura 4.12:** Perfil característico da adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à cultura de *Saccharomyces cerevisiae*, a estirpe com deleções das cinco peroxirredoxinas (BY4741-Δ5) analisada calorimetricamente no microcalorímetro de fluxo LKB-10-700. (A). A Figura mostra 3 adições bolus de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 μM, indicadas pelos círculos. (B e C) mostram uma ampliação da primeira e segunda adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respectivamente.

A análise quantitativa dos resultados foi feita calculando a potência dissipada causada por cada adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A potência foi calculada tal como anteriormente descrito na secção 4.4. Na impossibilidade de medir a densidade óptica na cultura que se encontra no calorímetro, esta foi estimado a partir de uma curva de crescimento experimental. Para estas experiências de adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na cultura em fase exponencial, a cultura era deixada a crescer na incubadora até atingir um valor de OD de aproximadamente 0,25. Transferiam-se então 20 mL para o reactor do sistema LKB 10700-1. Parte da cultura permanecia em crescimento na incubadora e esta era utilizada para recolher valores de OD<sub>600</sub> em função do tempo. Os dados obtidos eram ajustados a uma função exponencial (Figura 4.13) e esta utilizada para estimar OD<sub>600</sub> na altura das adições de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na amostra que se encontrava no calorímetro. Os resultados obtidos são mostrados no quadro 4.7.



**Figura 4.13:** Variação da densidade óptica a 600 nm em função do tempo de uma cultura da *Saccharomyces cerevisiae*, estirpe selvagem, para estimar valores de OD<sub>600</sub> por adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na cultura em questão.

**Quadro 4.7:** Potência dissipada por célula em cada uma das adições de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas diferentes estirpes em estudo. Os valores apresentados estão em picoJoules por segundo (pJ.S<sup>-1</sup>). \* Indica uma diferença estatística a 95 % com a estirpe selvagem (teste Anova com pós-teste Tuckey).

N	Estirpe wt			Estirpe ctt1			Estirpe Δ5		
	Potencia dissipada por célula/P <sub>o</sub> /pJ.s <sup>-1</sup> .cell <sup>-1</sup>								
Adição	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	2,036	1,977	1,912	1,281	1,252	0,901	0,780	0,659	0,71
2	1,609	1,937	1,490	1,602	1,324	1,021	0,953	0,725	0,650
3	2,522	2,550	1,820	1,832	2,062	1,445	0,997	0,836	0,725
4	1,355	1,035	1,303	1,506	1,539	1,375	0,952	0,821	0,732
5	1,465	1,672	1,740	1,878	1,616	1,435			
6	1,796	2,050	2,357	1,811	2,255				
Média	1,80	1,87	1,77	1,65	1,68	1,23	0,92*	0,76*	0,62*
D.Padrão	0,43	0,50	0,36	0,23	0,40	0,26	0,10	0,08	0,17

Da análise do quadro 4.7, é possível observar que quantitativamente não há alterações significativas na potência dissipada, quando se comparam as adições sequenciais de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em cada uma das estirpes. Comparando entre estirpes a diferença significativa que se observa é a menor potência dissipada (cerca de metade) no caso da estirpe deletada nos genes das 5 peroxirredoxinas. Reforça-se assim o resultado sobre a importância destes genes para a resposta ao metabolismo do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A grande vantagem de utilizar este microcalorimetro está relacionada com a sua sensibilidade em detectar transferências pequenas quantidades de calor, permitindo-nos assim detectar o aumento do metabolismo após adição em “bolus” de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tempo real. Porém devido ao tempo que a cultura demora a chegar à célula calorimétrica após a adição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, é possível que não tenhamos a total informação do que acontece exactamente na altura da adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a cultura. Será que há um



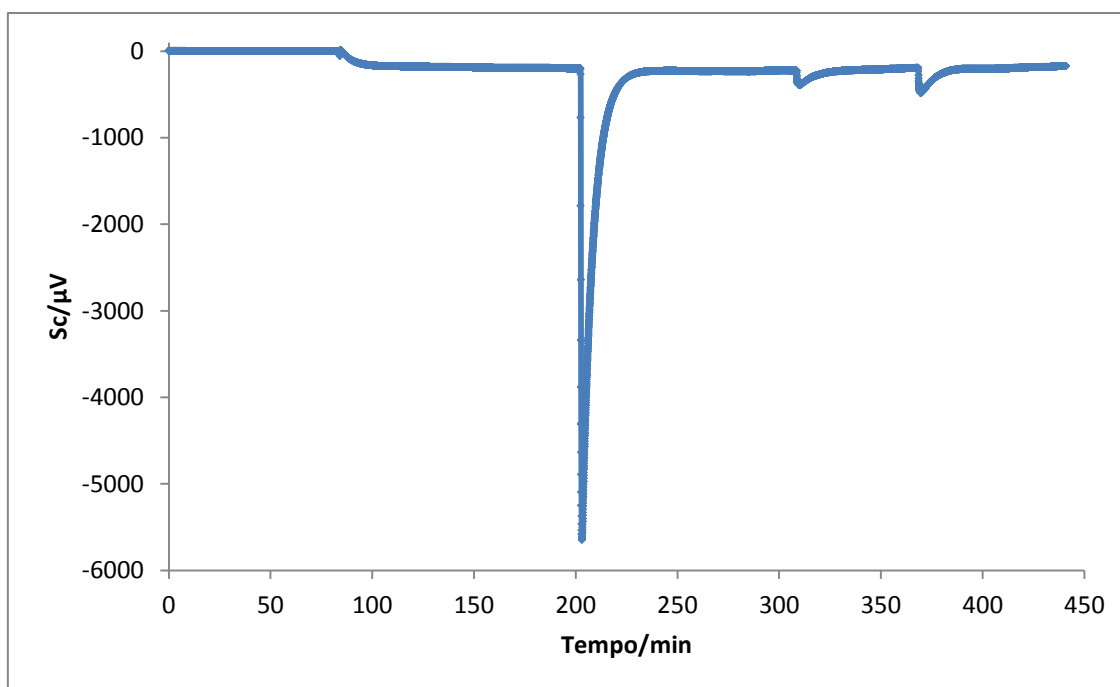
maior aumento do metabolismo do que aquele que foi observado e que quando a cultura chega à célula calorimétrica grande parte do calor gerado já tenha sido dissipado? Neste sistema é difícil responder a esta pergunta. Para tal terá de se repetir a mesma experiência em *batch* no calorímetro TAM (descrito na secção 3.1.2)

## **4.6 Estudos de calorimetria em *batch***

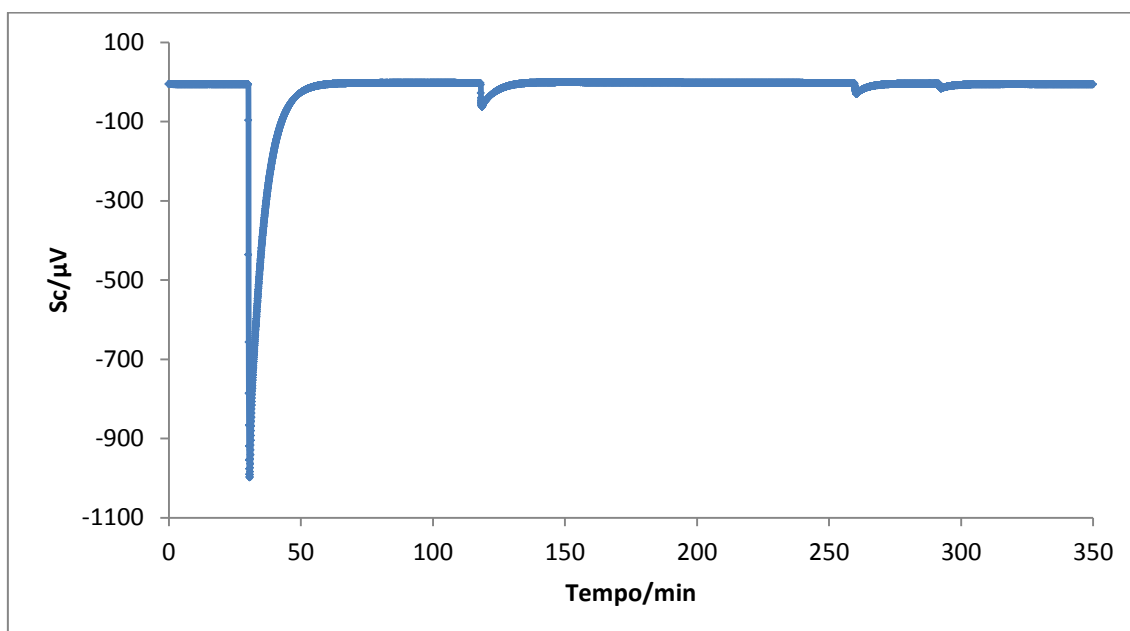
No calorímetro TAM, a cultura é colocada na célula calorimétrica de aço e igual volume de meio sc é colocado numa célula de referência também em aço, ambas ficam mergulhadas no banho a temperatura constante.

A primeira experiência de adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a cultura de *Saccharomyces cerevisiae* teve um resultado surpreendente, observando-se um grande pico imediatamente após a adição bolus de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150 µM) (Figura 4.14). De notar que na escala mostrada o declive referente ao crescimento das células não é visível, o que indica de facto a grande quantidade calor libertada pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este resultado não era esperado uma vez que não se encontra concordante com o perfil característico obtido no sistema de fluxo, mostrado na secção anterior. Para perceber se a libertação de calor observada é causada pelas células ou se seria causada pela reacção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com o meio sc, repetiu-se a experiência só que em vez de adicionar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à cultura de células, adicionou-se ao meio sc. O resultado encontra-se na Figura 4.15 onde se observa claramente a presença de um pico muito intenso, rejeitando claramente a hipótese de que todo o calor libertado seja causado apenas pelo aumento do metabolismo da cultura.

**Estudo Calorimétrico do efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae***  
**Resultados**



**Figura 4.14:** Adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à cultura *Saccharomyces cerevisiae* (estirpe selvagem) no TAM. O gráfico representa a tensão eléctrica em função do tempo (min). Os três picos são a primeira, a segunda e a terceira adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 μM, respectivamente.

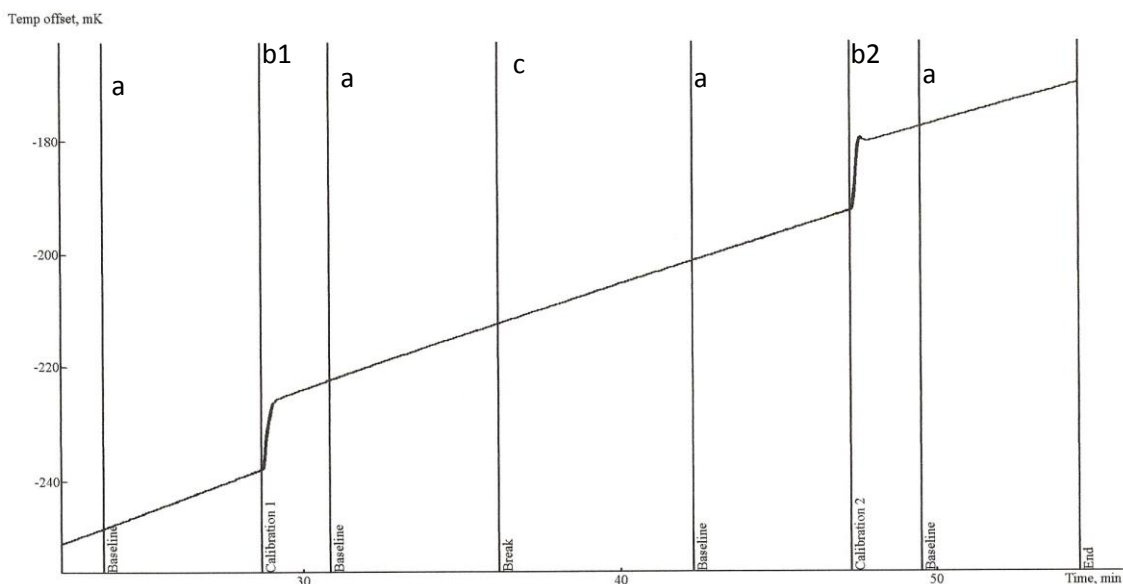


**Figura 4.15:** Adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao meio de cultura sc no TAM. O gráfico representa a tensão eléctrica em função do tempo (min). Os três picos são a primeira, a segunda e a terceira adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente.

**Estudo Calorimétrico do efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae***  
**Resultados**

Estes resultados levaram a uma pesquisa minuciosa sobre todos os componentes do meio de modo a perceber qual deles estaria a reagir com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para isso preparou-se meio sc em que cada elemento deixado de fora era substituído por igual volume de água. Esta pesquisa contudo mostrou-se infrutífera uma vez que os picos apareciam sempre, embora com diferentes intensidades (resultados não mostrados). Isto levou-nos a colocar a hipótese se estaria o meio a reagir com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou se seria a variação da entalpia de dissolução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no meio a causar os picos observados. Para testar a ultima hipótese recorreremos a calorimetria de solução (descrita na secção 3.1.3) para apoiar ou refutar a mesma.

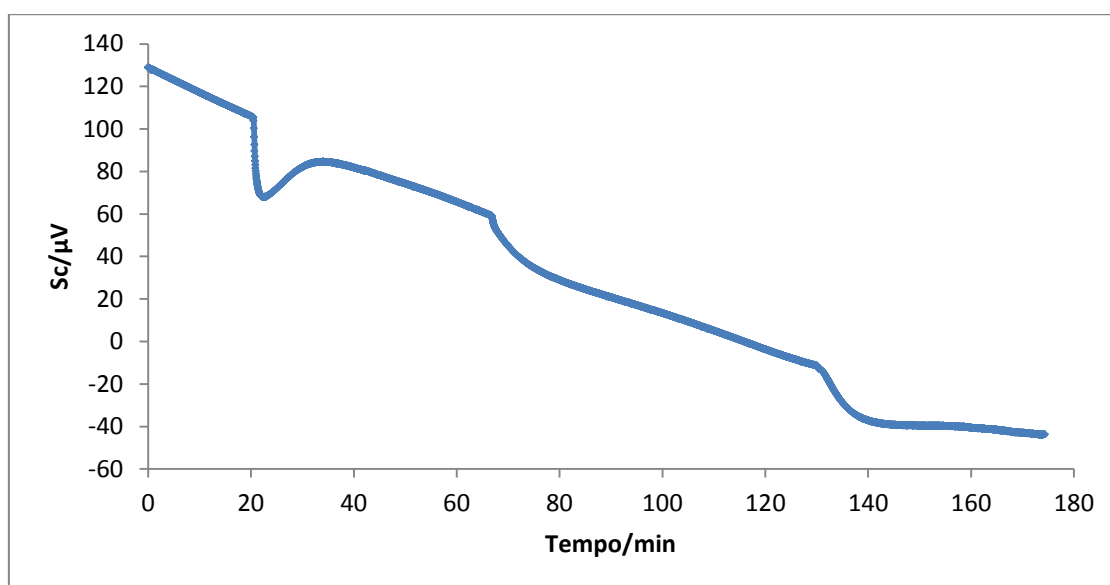
Os resultados obtidos para a entalpia molar de dissolução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no meio sc indicaram que a dissolução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não era responsável pelos picos observados no TAM (Figura 4.15). Os valores de variação de temperatura adiabática ( $\Delta T_{ad}$ ) obtidos encontram-se no intervalo de 0,000025 K a 0,0006 K. Assim a dissolução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no meio causa variações calorimétricas desprezáveis e semelhantes às encontradas quando se parte uma ampola vazia. Exemplo de um ensaio representado na Figura 4.16.



**Figura 4.16:** Curva da dissolução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no meio sc por calorimetria de solução a 298K. A Figura mostra a variação de temperatura em função do tempo: (a) linha de base, (b1 e b2) calibração eléctrica, (c) quebra da ampola com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Estudo Calorimétrico do efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae***  
**Resultados**

Estes resultados contrariam os picos, muito intensos, obtidos no meio sc seguidos calorimetricamente no calorímetro TAM. A origem destes picos terá uma outra explicação, não sendo resultado da entalpia de dissolução. A hipótese mais provável será a existência de componentes da célula calorimétrica que reagem ou catalisam reacções do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com o meio sc. A célula calorimétrica deste calorímetro é de aço e este pode conter metais que reagem com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou então catalisar reacção deste com componentes do meio. Para ultrapassar este problema foi necessário então substituir as células de aço por células em plástico. A célula de plástico construída encontra-se na secção 3.1.2, Figura 3.10 B.



**Figura 4.17:** Adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a uma cultura de *Saccharomyces cerevisiae* (estirpe selvagem) no TAM numa célula de plástico. Representa-se a tensão eléctrica em função do tempo (s). Os três picos são a primeira, a segunda e a terceira adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150 μM), respectivamente.

Na Figura 4.17 é mostrado o perfil calorimétrico da resposta de uma cultura de *Saccharomyces cerevisiae* (estirpe selvagem) ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este perfil é qualitativamente idêntico aos obtidos na secção anterior. Este estudo é ainda preliminar mas permite validar os resultados obtidos na secção anterior no sentido em que nos primeiros 2 minutos após a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não ocorrem variações muito rápidas que possam passar despercebidas no calorímetro de fluxo. Utilizando o calorímetro TAM temos a vantagem de observar o efeito no metabolismo

***Estudo Calorimétrico do efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae****  
**Resultados**

imediatamente durante a adição do oxidante. Porém uma limitação deste é o facto de demorar muito mais tempo a equilibrar com a cultura, pois quando se coloca a célula calorimétrica com a cultura, o aparelho fica completamente desequilibrado, o que não ocorre no microcalorímetro de fluxo. Conclui-se que a utilização complementar destes dois aparelhos serão úteis no estudo do efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no metabolismo da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

## 5 DISCUSSÃO

Conforme anteriormente mencionado o trabalho desenvolvido nesta tese enquadra-se num projecto que tem por objectivo investigar a possibilidade de utilizar o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como um fármaco. Esta tese centrou-se no desenvolvimento instrumental e de procedimento de um método calorimétrico para estudar alterações metabólicas induzidas pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A primeira questão abordada neste trabalho foi: Será possível detectar alterações de actividade metabólica induzidas por adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por microcalorimetria? Com recurso aos microcalorímetros LKB 10700-1 (experiências em fluxo) e Thermal Analysis Monitor TAM (experiências em “batch”) foi possível detectar e quantificar o calor associado ao crescimento normal de culturas de *Saccharomyces cerevisiae*. Foi ainda possível detectar alterações nas curvas de crescimento associadas à adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Desenvolveu-se assim, uma metodologia promissora para ajudar a compreender a acção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando adicionado em diferentes concentrações às culturas celulares. Os resultados obtidos enquadram-se, no geral, no conhecimento actual da resposta ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pelo que se pode concluir que este trabalho contribuiu para a validação da técnica da microcalorimetria ao estudo dos efeitos biológicos deste oxidante, sendo esta a principal contribuição deste trabalho.

Embora a calorimetria permita obter informação sobre alterações metabólicas associadas à adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (por exemplo, o mecanismo acelera ou desacelera) em tempo real, tem a desvantagem de não dar informação sobre as vias metabólicas implicadas nas alterações observadas. Obtém-se apenas, uma visão do metabolismo global, desconhecendo por completo quais os processos catabólicos ou anabólicos responsáveis pela resposta calorimétrica.

A estratégia utilizada para ultrapassar esta limitação baseou-se no uso de várias estirpes isogénicas à selvagem (wt) com falta de determinado (s) gene (s) potencialmente implicados no metabolismo do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de modo a testar se estes genes são ou não importante na resposta ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nesta tese foram utilizadas três estirpes: a

estirpe selvagem, a estirpe com deleção do gene da catalase citosólico (ctt1), e a estirpe com deleções em genes que codificam para cinco peroxirredoxinas.

Obtiveram-se inicialmente curvas de crescimentos das três estirpes utilizadas (Figura 4.5) onde se pode observar que todas são viáveis; o padrão de crescimento das estirpes wt e ctt1 é essencialmente idêntico, não se observando alterações significativas no crescimento devido a ausência do gene do catalase, o que está de acordo com o reportado na literatura (Izawa et al., 1996b). Nota-se, porém, um ligeiro atraso no crescimento do quádruplo mutante ( $\Delta 5$ ), conforme previamente descrito na literatura (Wong et al., 2004). Quantitativamente, a potência dissipada por célula nas três culturas em condições de crescimento exponencial é muito semelhante entre si, dentro do erro experimental,  $21.1 \pm 1.6$ ,  $20.0 \pm 2.1$  e  $18.1 \pm 3.9$  pJ.s<sup>-1</sup>/célula para as estirpes wt, ctt1 e  $\Delta 5$ , respectivamente. Conclui-se assim, que a deleção destes genes tem um impacto nulo ou pouco significativo no metabolismo normal das células na ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> externo.

As curvas de crescimentos obtidas calorimetricamente mostram claramente o aumento do número de célula em função do tempo traduzido pelo aumento do sinal calorimétrico. O padrão de crescimento observado está concordante com o obtido seguindo a densidade óptica das culturas. A calorimetria apresenta algumas vantagens em relação ao método espectroscópico: não necessita de transparência óptica e dá informação do instante em que a cultura abandona o seu metabolismo como verificado na Figura 4.6. Uma outra informação muito interessante foi a detecção de pequenas oscilações perto do final da fase exponencial da curva de crescimento. Estas oscilações devem ser devidas a oscilações que ocorrem na regulação metabólica. Com a diminuição de nutrientes no meio de cultura as células regulam a sua taxa metabólica, uma vez que escasseiam substratos para obtenção de energia. As oscilações metabólicas, nomeadamente ao nível da glicólise são bem conhecidas, sendo observadas em vários tipos de células incluindo em leveduras (Teusink et al., 1996). No entanto, o aparecimento destas oscilações é normalmente desencadeado por condições experimentais específicas, como sendo a inibição da cadeia respiratória (Hald et al., 2012) ou condições específicas da alimentação da cultura (Silverman et al.,

2010). Tanto quanto sabemos esta foi a primeira vez que estas oscilações foram observadas durante o crescimento normal sem manipulações externas.

Nas experiências que tinham por objectivo investigar a resposta celular à agressão com uma dose não letal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concluiu-se que não há diferenças significativas entre as estirpes wt e ctt1. Este facto já foi reportado anteriormente (Izawa et al., 1996b). Este fenómeno é explicado pela existência de vias independentes do catalase que permitem eliminar o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> da célula, sendo o catalase importante para a adaptação à presença do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, quer por adição externa quer durante a fase estacionária de crescimento da levedura (Izawa et al., 1996b). Porém a estirpe  $\Delta 5$  responde muito mais lentamente à adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sugerindo as proteínas codificadas pelos genes deletados desempenham um papel importante na resposta oxidativa em fase exponencial. Estes dados são concordantes com estudos onde se mostra que o mutante  $\Delta 5$  apresenta uma maior sensibilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que a estirpe selvagem (Wong et al., 2004). De notar que as peroxirredoxinas são das proteínas mais abundantes em levedura, nomeadamente a TSA1 (Ghaemmighami et al., 2003) e têm uma constante cinética muito elevada para a reacção com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cerca de  $10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (Ogusucu et al., 2007). Pelo contrário o catalase apesar de ter uma constante cinética semelhante (Chance et al., 1952) é muito menos abundante que as peroxirredoxinas (Ghaemmighami et al., 2003).

O perfil calorimétrico ilustrado na Figura 4.10 que se refere à cultura de *Saccharomyces cerevisiae* wt, mostra que, após a primeira adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> há inicialmente uma queda do sinal, que volta depois a aumentar ligeiramente formando um “ombro”. Nas adições subsequentes tal ombro não é observado o que pode ser indicativo de uma adaptação por parte da cultura ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este comportamento é também observado no caso da estirpe ctt1 (Figura 4.11) mas não para o quádruplo mutante (Figura 4.12). Este demora muito mais tempo a voltar ao declive de crescimento inicial (antes da adição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sugerindo que esta estirpe, tem uma maior dificuldade em responder à adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este tipo de resultados obtido em tempo real em células vivas é novo, constituindo uma mais valia da calorimetria.



Em relação ao efeito da adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na potência média dissipada por célula os resultados são inconclusivos, não tendo sido possível verificar inequivocamente se a potência diminui ou aumenta da primeira para a segunda e da segunda para a terceira adição. Os valores obtidos da potência dissipada por célula (quadro 4.7) foram determinados com uma estimativa do número de células baseada numa medida de densidade óptica realizada numa cultura paralela. O facto de a densidade óptica não ser determinada no calorímetro aumenta o erro da determinação. A estratégia para ultrapassar este facto será utilizar uma sonda de turbidimetria no reactor contendo a cultura celular o que permitirá monitorizar simultaneamente o sinal calorimétrico e o correspondente valor de densidade óptica.

O microcalorímetro de fluxo LKB permite acompanhar o crescimento celular e observar alterações provocadas pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Não permite porém detectar reacções celulares muito rápidas uma vez que a adição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ocorre num reactor situado fora da célula calorimétrica. De facto, o percurso da cultura entre o reactor e a célula calorimétrica demora algum tempo decorrendo ~2 min até à detecção de uma alteração do sinal calorimétrico. Experiências em que a cultura e a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são efectuadas directamente na célula calorimétrica podem ser realizadas com o calorímetro TAM; descrito na secção 3.1.2. A primeira experiência realizada neste calorímetro com uma célula de aço (secção 3.6), foi surpreendente, observando-se um grande pico imediatamente após a adição bolus de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150 µM) a cultura de *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 4.14). Na repetição da experiência porém com adição ao meio sc também observou-se o grande pico (Figura 4.15), confirmando assim que o pico da experiência anterior não era apenas libertação de calor da cultura. A pesquisa minuciosa sobre todos os componentes do meio de modo a perceber qual deles estaria a reagir com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mostrou-se infrutífera uma vez que os picos apareciam sempre, embora com diferentes intensidades. Com auxílio da calorimetria de solução reacção chegou-se a conclusão que a possível causa da grande variação do sinal estivesse relacionado com a utilização de células de aço. A substituição destas células por outras de plásticos solucionou o problema. Os resultados preliminares neste calorímetro (Figura 4.17) estão de acordo com os resultados obtidos no calorímetro de fluxo.

Em conclusão, nesta tese foram realizados os primeiros passos para estudar os efeitos do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células. O trabalho envolveu em grande parte o desenvolvimento instrumental e de procedimentos de modo a ultrapassar dificuldades específicas associadas à utilização de leveduras e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Uma vez feita esta optimização foi possível efectuar estudos que corroboraram o conhecimento actual sobre a contribuição do catalase e das peroxirredoxinas para a resposta metabólica ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Podemos concluir assim que se validou a aplicação da microcalorimetria ao estudo dos efeitos biológicos do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## 6 BIBLIOGRAFIA

Académie des sciences (1780). Histoire de l'Académie royale des sciences ... avec les mémoires de mathématique & de physique... tirez des registres de cette Académie (Imprimerie de Du Pont (Paris)).

Aruoma, O.I., Grootveld, M., and Bahorun, T. (2006). Free radicals in biology and medicine: from inflammation to biotechnology. *Biofactors* 27, 1–3.

Bjelakovic, G., Nikolova, D., Gluud, L.L., Simonetti, R.G., and Gluud, C. (2007). Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 297, 842–857.

Björkman, L., Dahlgren, C., Karlsson, A., Brown, K.L., and Bylund, J. (2008). Phagocyte-derived reactive oxygen species as suppressors of inflammatory disease. *Arthritis Rheum.* 58, 2931–2935.

Le Bourg, E. (2007). Hormetic effects on longevity of hydrogen peroxide in *Drosophila melanogaster* flies living on a poorly nutritious medium. *Biogerontology* 8, 327–344.

Branco, M.R., Marinho, H.S., Cyrne, L., and Antunes, F. (2004). Decrease of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plasma membrane permeability during adaptation to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279, 6501–6506.

Brown, M.E. (1998). *Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry: Principles and Practice* (Elsevier).

Calabrese, E.J., and Baldwin, L.A. (2003). Hormesis: the dose-response revolution. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 175–197.

Chae, H.Z., Chung, S.J., and Rhee, S.G. (1994). Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J. Biol. Chem.* 269, 27670–27678.

Chance, B., Greenstein, D.S., and Roughton, F.J.W. (1952). The mechanism of catalase action. I. Steady-state analysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 37, 301–339.

Chance, B., Sies, H., and Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59, 527–605.

Davies, J.M., Lowry, C.V., and Davies, K.J. (1995). Transient adaptation to oxidative stress in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 317, 1–6.

Elchebly, M. (1999). Increased Insulin Sensitivity and Obesity Resistance in Mice Lacking the Protein Tyrosine Phosphatase-1B Gene. *Science* 283, 1544–1548.

Forman, H.J., Maiorino, M., and Ursini, F. (2010). Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc.)* 49, 835–842.

Forman, H.J., Davies, K.J.A., and Ursini, F. (2014). How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* 66, 24–35.

**Bibliografia**

- Galiazzo, F., Schiesser, A., and Rotilio, G. (1987). Glutathione peroxidase in yeast. Presence of the enzyme and induction by oxidative conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **147**, 1200–1205.
- Gardner, P.R., and Fridovich, I. (1991). Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* aconitase. *J. Biol. Chem.* **266**, 19328–19333.
- Gershon, H., and Gershon, D. (2000). The budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as a model for aging research: a critical review. *Mech. Ageing Dev.* **120**, 1–22.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W.-K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K., and Weissman, J.S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**, 737–741.
- Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J.-M., Kieffer, S., Perrot, M., Boucherie, H., Toledano, M.B., and Labarre, J. (1998). The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**, 22480–22489.
- Goodman, M., Bostick, R.M., Kucuk, O., and Jones, D.P. (2011). Clinical trials of antioxidants as cancer prevention agents: Past, present, and future. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 1068–1084.
- Grant, C.M. (2001). Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Mol. Microbiol.* **39**, 533–541.
- Grant, C.M., Collinson, L.P., Roe, J.H., and Dawes, I.W. (1996). Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol. Microbiol.* **21**, 171–179.
- Hald, B.O., Smrcinova, M., and Sørensen, P.G. (2012). Influence of cyanide on diauxic oscillations in yeast. *FEBS J.* **279**, 4410–4420.
- Haque, A., Andersen, J.N., Salmeen, A., Barford, D., and Tonks, N.K. (2011). Conformation-Sensing Antibodies Stabilize the Oxidized Form of PTP1B and Inhibit Its Phosphatase Activity. *Cell* **147**, 185–198.
- Hiltunen, J.K., Mursula, A.M., Rottensteiner, H., Wierenga, R.K., Kastaniotis, A.J., and Gurvitz, A. (2003). The biochemistry of peroxisomal  $\beta$ -oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 35–64.
- Izawa, S., Inoue, Y., and Kimura, A. (1996a). Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **320** ( Pt 1), 61–67.
- Izawa, S., Inoue, Y., and Kimura, A. (1996b). Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **320**, 61–67.
- Jamieson DJ (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **14**, 1511–1527.
- Jr, I.T., Sauer, K., Wang, J.C., Puglisi, J.D., Harbison, G., and Rovnyak, D. (2013). *Physical Chemistry: Principles and Applications in Biological Sciences* (Boston: Prentice Hall).

**Bibliografia**

- Kaszubska, W., Falls, H.D., Schaefer, V.G., Haasch, D., Frost, L., Hessler, P., Kroeger, P.E., White, D.W., Jirousek, M.R., and Trevillyan, J.M. (2002). Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates leptin signaling in a hypothalamic cell line. *Mol. Cell. Endocrinol.* **195**, 109–118.
- Kendig, E.L., Le, H.H., and Belcher, S.M. (2010). Defining hormesis: evaluation of a complex concentration response phenomenon. *Int. J. Toxicol.* **29**, 235–246.
- Kleiber, M. (1961). *The fire of life: an introduction to animal energetics* (New York: Wiley).
- Lee, S.P., Hwang, Y.S., Kim, Y.J., Kwon, K.-S., Kim, H.J., Kim, K., and Chae, H.Z. (2001). Cyclophilin A Binds to Peroxiredoxins and Activates Its Peroxidase Activity. *J. Biol. Chem.* **276**, 29826–29832.
- Leskiv, M., Bernardes, C.E.S., and Minas da Piedade, M.E. (2009). A calorimetric system based on the LKB 10700-1 flow microcalorimeter. *Meas. Sci. Technol.* **20**, 075107.
- M. A. A. O'Neill, A.E.B. (2003). The base catalysed hydrolysis of methyl paraben, a test reaction for flow microcalorimeters used for determination of both kinetic and thermodynamic parameters. *Thermochimica Acta* **399**, 63–71.
- Mahadev, K. (2001). Insulin-stimulated Hydrogen Peroxide Reversibly Inhibits Protein-tyrosine Phosphatase 1B in Vivo and Enhances the Early Insulin Action Cascade. *J. Biol. Chem.* **276**, 21938–21942.
- Marsh, K.N. (1987). *Recommended Reference Materials for the Realization of Physicochemical Properties* (Oxford: IUPAC-Blackwell Scientific Publications:).
- Mesquita, A., Weinberger, M., Silva, A., Sampaio-Marques, B., Almeida, B., Leão, C., Costa, V., Rodrigues, F., Burhans, W.C., and Ludovico, P. (2010). Caloric restriction or catalase inactivation extends yeast chronological lifespan by inducing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and superoxide dismutase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 15123–15128.
- Nelson, D.L., and Cox, M.M. (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry* (New York: W. H. Freeman).
- Nunes, N., Martins, F., and Leitão, R.E. (2006). Thermochemistry of 1-bromoadamantane in binary mixtures of water–aprotic solvent. *Thermochim. Acta* **441**, 27–29.
- Ogusucu, R., Rettori, D., Munhoz, D.C., Netto, L.E.S., and Augusto, O. (2007). Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: rate constants by competitive kinetics. *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 326–334.
- Park, S.G., Cha, M.K., Jeong, W., and Kim, I.H. (2000). Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**, 5723–5732.
- Rettori, D., and Volpe, P.L. (2000). Microcalorimetria: uma técnica aplicável ao estudo do diauxismo da *saccharomyces cerevisiae*. *Quím. Nova* **23**, 257–261.
- Schroder, K., Zhang, M., Benkhoff, S., Mieth, A., Pliquett, R., Kosowski, J., Kruse, C., Luedike, P., Michaelis, U.R., Weissmann, N., et al. (2012). Nox4 Is a Protective Reactive Oxygen Species Generating Vascular NADPH Oxidase. *Circ. Res.* **110**, 1217–1225.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* **82**, 291–295.

**Bibliografia**

- Silva, M.A.V.R.D. (1984). Thermochemistry and Its Applications to Chemical and Biochemical Systems: The Thermochemistry of Molecules, Ionic Species and Free Radicals in Relation to the Understanding of Chemical and Biochemical Systems (Dordrecht Holland ; Boston [Mass.] : Hingham, MA: Springer).
- Silverman, S.J., Petti, A.A., Slavov, N., Parsons, L., Briehof, R., Thiberge, S.Y., Zenklusen, D., Gandhi, S.J., Larson, D.R., Singer, R.H., et al. (2010). Metabolic cycling in single yeast cells from unsynchronized steady-state populations limited on glucose or phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 6946–6951.
- Simões, J.A.M., and Piedade, M.E.M. (2008). Molecular Energetics Condensed-Phase Thermochemical Techniques (NewYork: Oxford University Press).
- Temple, M.D., Perrone, G.G., and Dawes, I.W. (2005). Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol.* **15**, 319–326.
- Teusink, B., Larsson, C., Diderich, J., Richard, P., Dam, K. van, Gustafsson, L., and Westerhoff, H.V. (1996). Synchronized Heat Flux Oscillations in Yeast Cell Populations. *J. Biol. Chem.* **271**, 24442–24448.
- Tymoczko, J.L., and Stryer, L. (2006). Biochemistry (New York: W. H. Freeman).
- Wong, C.-M., Siu, K.-L., and Jin, D.-Y. (2004). Peroxiredoxin-null yeast cells are hypersensitive to oxidative stress and are genomically unstable. *J. Biol. Chem.* **279**, 23207–23213.
- Wood, Z.A., Schröder, E., Robin Harris, J., and Poole, L.B. (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 32–40.
- Yokoo, S., Furumoto, K., Hiyama, E., and Miwa, N. (2004). Slow-down of age-dependent telomere shortening is executed in human skin keratinocytes by hormesis-like-effects of trace hydrogen peroxide or by anti-oxidative effects of pro-vitamin C in common concurrently with reduction of intracellular oxidative stress. *J. Cell. Biochem.* **93**, 588–597.
- Yoo, S.K., Starnes, T.W., Deng, Q., and Huttenlocher, A. (2011). Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction in vivo. *Nature* **480**, 109–112.
- [http://es.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces\\_cerevisiae](http://es.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae), (Ultimo acesso 25/09/14).